

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

Sumáya Karla Faria Neves

**Avaliação da atividade estrogênica em efluente sanitário bruto e tratado em uma estação
de tratamento com sistema de lodos ativados com aeração prolongada**

Juiz de Fora

2023

Sumáya Karla Faria Neves

Avaliação da atividade estrogênica em efluente sanitário bruto e tratado em uma estação de tratamento com sistema de lodos ativados com aeração prolongada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento e Meio Ambiente.

Orientadora: Dra. Renata de Oliveira Pereira

Coorientadora: Dra. Sue Ellen Costa Bottrel

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Faria Neves, Sumáya Karla.

Avaliação da atividade estrogênica em efluente sanitário bruto e tratado em uma estação de tratamento com sistema de lodos ativados com aeração prolongada / Sumáya Karla Faria Neves. -- 2023.

128 p. : il.

Orientadora: Renata de Oliveira Pereira

Coorientadora: Sue Ellen Costa Bottrel

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2023.

1. Ensaio YES (yeast strogen screen). 2. desreguladores endócrinos. 3. esgoto doméstico. 4. tratamento de esgoto. 5. hormônios. I. Pereira, Renata de Oliveira , orient. II. Bottrel, Sue Ellen Costa , coorient. III. Título.

Sumáya Karla Faria Neves

Avaliação da atividade estrogênica em efluente sanitário bruto e tratado em uma estação de tratamento com sistema de lodos ativados com aeração prolongada

Dissertação apresentada ao Programa da Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento e Meio Ambiente.

Aprovada em 19 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata de Oliveira Pereira - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Profa. Dra. Sue Ellen Costa Bottrel - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Profa. Dra. Daniele Maia Bila

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof. Dr. Edgard Henrique Oliveira Dias

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Juiz de Fora, 19/09/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Edgard Henrique Oliveira Dias, Professor(a)**, em 20/09/2023, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata de Oliveira Pereira, Professor(a)**, em 20/09/2023, às 15:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sue Ellen Costa Bottrel, Professor(a)**, em 21/09/2023, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele Maia Bila, Usuário Externo**, em 21/09/2023, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sumáya Karla Faria Neves, Usuário Externo**, em 08/12/2023, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1468373** e o código CRC **D92AB771**.

Dedico, com muito amor, à minha mãe, Leci.
O seu esforço, amor e incentivo foram
essenciais para realização dessa etapa. Te
amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, por me guiar e ter me dado forças para concluir mais uma etapa da minha jornada acadêmica e profissional.

Aos meus pais Leci e Antônio, pelo amor, apoio e suporte incondicionais em todos os momentos da minha vida. Obrigada por todos os valores e por serem os maiores incentivadores dos meus estudos. Sem vocês a caminhada até aqui seria mais difícil ou impossível.

As minhas orientadoras, Renata e Sue Ellen, pelo conhecimento compartilhado, suporte e confiança depositados em mim e neste trabalho. Obrigada não só pela orientação acadêmica, mas também pela generosidade e compreensão e pela experiência que levarei por toda a vida.

À Iramaia pela amizade e pelo auxílio nas análises laboratoriais. Obrigada por todo carinho, ele foi essencial para que o meu trabalho pudesse ser desenvolvido com mais alegria e leveza.

À minha “professora” Giselle Gomes por toda ajuda, conhecimento e conselhos compartilhados durante os ensaios YES. A sua amizade, paciência e atenção foram fundamentais no desenvolvimento do meu projeto.

Ao Allan Argollo pela ajuda na realização dos ensaios YES, mesmo sem me conhecer pessoalmente, e à professora Daniele Bila pela disponibilização da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* e apoio nas análises para a realização dos ensaios YES.

Ao professor Samuel pela atenção e pela troca de conhecimentos estatísticos desde a graduação.

A equipe YES, por Lucas, Pedro Antônio e Camilla e as “meninas da micro”, Lidiane, Carol, Maria Clara, Millena e Pamella, pelo auxílio nas coletas, nas análises físico-químicas e nos ensaios YES. Muito obrigada pela parceria!

A toda minha família, em especial a minha avó Gilda, as minhas tias Anna, Léa e Lenir, e ao meu primo Mike, por todo incentivo e palavras de carinho.

Aos meus amigos da turma de mestrado, Ana, Pedro (minha “duplinha” de trabalhos), Dani e Vinícius, por toda parceria e amizade.

Aos meus amigos pessoais, André, Aninha, Carol, Estevão, Giselle, Iago, Lara, Marcília, Maju, Mayza, Victor, Léo e Tércio. Muito obrigada por toda motivação e pelos momentos de diversão e alegria. Vocês foram fundamentais para me dar ânimo nos momentos mais difíceis.

Gratidão a todos que passaram comigo por essa jornada e que deram o suporte para findar essa etapa, destaque ao Christian, pelo apoio emocional e companheirismo. Meus mais sinceros agradecimentos.

Aos professores Daniele Bila e Edgard Dias por aceitarem o convite de participar da minha banca de dissertação.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e a Universidade Federal de Juiz de Fora por prezarem e proporcionarem um ensino de excelência e qualidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitou a realização dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, obrigada pelo suporte financeiro que incentiva e possibilita lutar pelo avanço da pesquisa no país.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Os desreguladores endócrinos são compostos capazes de causar efeitos danosos à saúde, podendo afetar no crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento de seres vivos. Esses compostos estão presentes nos efluentes domésticos, em sua maioria na forma de composto estrogênicos. O tratamento convencional de efluentes domésticos não objetiva a remoção de tais substâncias, e por consequência elas atingem os corpos hídricos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade estrogênica de efluente sanitário bruto e tratado, de uma estação de tratamento de esgotos (ETE) com sistema de lodos ativados por aeração prolongada. O efluente sanitário foi caracterizado de maio de 2019 a junho de 2022, quanto aos parâmetros físico-químicos e em relação a atividade estrogênica da fase líquida pelo ensaio *in vitro* *Yeast Estrogen Screen*, reportado em nanogramas equivalente de 17β -estradiol por litro ($\text{ngEQ-E}_2\text{L}^{-1}$). A ETE alcançou eficiências de remoção de DQO, SST e N-NH_3 , de 85%, 71% e 46%, por ordem. A ETE conseguiu atender aos padrões da Resolução COPAM-CERH nº 8/2022, com exceção do N-NH_3 , que superou o valor máximo permitido em 57% das coletas. 85% das amostras de efluente bruto apresentaram atividade estrogênica, enquanto as de efluente tratado, 50%. A atividade estrogênica no efluente bruto variou entre menor que o limite de detecção (LD) e $543,90 \text{ ngEQ-E}_2\text{L}^{-1}$ e no efluente tratado entre $<\text{LD}$ e $95,48 \text{ ngEQ-E}_2\text{L}^{-1}$, apresentando desvio significativo entre as amostras. O CE50 mediano foi de $84,11 \pm 172,29 \text{ ngEQ-E}_2\text{L}^{-1}$ e o LD e LQ de $0,15 \pm 0,05$ e $0,44 \pm 0,14 \text{ ngEQ-E}_2\text{L}^{-1}$, respectivamente. A recuperação da amostra dopada com E2 foi de aproximadamente 84%. A remoção média de estrogenicidade foi de 86%, condizente com o esperado para sistemas de LA e suas variantes. Porém, as concentrações estimadas no corpo receptor após o lançamento do efluente tratado foram entre 0,0005 e $0,43 \text{ ngEQ-E}_2\text{L}^{-1}$. A concentração máxima, está acima dos valores considerados como potenciais causadores de efeitos adversos ao ecossistema aquático. Portanto, conclui-se que é necessário a adoção de estratégias como o uso racional de compostos estrogênicos para minimizar as suas concentrações no esgoto, bem como a realização de mais pesquisas que contribuam para sua inclusão como parâmetros de monitoramento de águas residuárias, com o objetivo de fomentar a adoção de estratégias e de novas tecnologias que objetivem aumentar a sua remoção nas ETes.

Palavras-chave: Ensaio YES (*Yeast estrogen screen*), desreguladores endócrinos, esgoto doméstico, tratamento de esgoto, hormônios.

ABSTRACT

Endocrine disruptors are compounds capable of causing harmful effects on health and can affect the growth, development, reproduction and behavior of living beings. These compounds are present in domestic effluents, mostly in the form of estrogenic compounds. Conventional treatment of domestic effluents does not objectively remove such substances, and consequently they affect water bodies. Therefore, the objective of this work was to determine the estrogenic activity of raw and treated sanitary effluent from a sewage treatment plant (STP) with a sludge system activated by prolonged aeration. The sanitary effluent was characterized from May 2019 to June 2022, in terms of physical-chemical parameters in relation to the physicochemical parameters and the estrogenic activity of the liquid phase by the *in vitro* assay, reported in nanograms equivalent of 17 β -estradiol (ngEQ-E2. L⁻¹). The STP achieved COD, TSS and N-NH₃ removal efficiencies of 85%, 71% and 46%, in order. The STP managed to meet the standards of COPAM-CERH Resolution n° 8/2022, with the exception of N-NH₃, which exceeded the maximum value allowed in 57% of collections. 85% of the raw effluent samples had estrogenic activity, while 50% of the treated effluent. Estrogenic activity in raw effluent varies between <LD and 543.90 ng-EQ-E2.L⁻¹ and in treated effluent between <LD and 95.48 ng-EQ-E2.L⁻¹, showing significant deviation between samples. The median EC₅₀ was 84.11 \pm 172.29 ng.L⁻¹ and the LD and LQ were 0.15 \pm 0.05 and 0.44 \pm 0.14 ngEQ-E2.L⁻¹, respectively. The recovery of the E2-doped sample was approximately 84%. The average estrogenicity removal was 86%, consistent with what is expected for LA systems and their variants. However, the estimated estimates in the receiving body after the discharge of the treated effluent were between 0.0005 and 0.43 ngEQ-E2.L⁻¹. The maximum concentration is above values considered to potentially cause adverse effects on aquatic biodiversity. Therefore, it is concluded that it is necessary to adopt strategies such as the rational use of estrogenic compounds to minimize their concentrations in sewage, as well as to carry out more research that contributes to their inclusion as wastewater monitoring parameters, with the aim of encourage the adoption of strategies and new technologies that aim to increase their removal in STPs.

Keywords: YES assay (Yeast estrogen screen), endocrine disruptors, domestic sewage, sewage treatment, hormones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do sistema de expressão do receptor estrogênico induzido por substâncias estrogênicas em <i>Sacharomyces cerevisiae</i> BJ1991.	42
Figura 2 – Principais tipos de tratamentos de efluentes domésticos utilizados no Brasil.	43
Figura 3 – Gradeamento.	48
Figura 4 – Desarenador.	48
Figura 5 – Tanque de aeração.	49
Figura 6 – Decantador secundário.	49
Figura 7 – <i>Manifold</i> utilizado para extração das amostras.	53
Figura 8 – Esquema do preparo até o extrato final das amostras utilizado no ensaio YES.	54
Figura 9 – Esquema do cultivo e conservação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Figura 10 – Disposição do controle positivo (17 β -estradiol), da amostra e do controle negativo na placa de análise.	57
Figura 11 – Esquema das etapas do ensaio YES.	58
Figura 12 – Resumo das etapas antes do cálculo da concentração EQ-E2 de cada amostra. ...	63
Figura 13 – Gráficos <i>box and whisker</i> dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, DQO total e SST) para amostras de efluente bruto e tratado.	68
Figura 14 – Gráficos <i>box and whisker</i> dos parâmetros físico-químicos (NTK, N-NH ₃ , Norg e NO ₃ ⁻) para amostras de efluente bruto e tratado.	69
Figura 15 – Gráficos <i>box and whisker</i> dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, DQO total e SST) para amostras de efluente bruto nos períodos de chuva e estiagem.	70
Figura 16 – Gráficos <i>box and whisker</i> dos parâmetros físico-químicos (NTK, N-NH ₃ , Norg e NO ₃ ⁻) para amostras de efluente bruto nos períodos de chuva e estiagem.	71
Figura 17 – Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol no ensaio YES. .	78
Figura 18 – Placas de ensaio YES com inibição do crescimento celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
Figura 19 – Gráfico <i>box and whisker</i> das concentrações de atividade estrogênica (ngEQ-E2.L ⁻¹) do efluente bruto e do efluente tratado.	83
Figura 20 – Gráfico <i>box and whisker</i> da atividade estrogênica (ngEQ-E2.L ⁻¹) no efluente bruto nos períodos chuva e estiagem.	84
Figura 21 – Gráfico das concentrações de atividade estrogênica (ngEQ-E2.L ⁻¹) do efluente e do efluente tratado por coleta realizada.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação e exemplos de desreguladores endócrinos (continua).	23
Tabela 2 – Diferentes mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos na saúde humana.	25
Tabela 3 – Ocorrência de compostos estrogênicos em corpos hídricos superficiais no Brasil (continua).	28
Tabela 4 – Ocorrência de compostos estrogênicos em estações de tratamento de efluentes domésticos no Brasil.	30
Tabela 5 – Efeitos atribuídos aos compostos estrogênicos em animais selvagens (continua). ..	33
Tabela 6 – Efeitos atribuídos aos compostos estrogênicos em seres humanos.	36
Tabela 7 – Ocorrência e remoção da atividade estrogênica em estações de tratamento de efluentes domésticos por diferentes tipos de ensaios <i>in vitro</i>	44
Tabela 8 – Principais compostos estrogênicos e suas propriedades físico-químicas.	45
Tabela 9 – Dados das coletas.	50
Tabela 10 – Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias.	51
Tabela 11 – Composição característica do esgoto bruto.	67
Tabela 12 – Avaliação qualitativa da atividade estrogênica das amostras de efluente bruto e tratado de cada coleta.	77
Tabela 13 – Citotoxicidade nas amostras de efluente sanitário analisadas (continua).	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-YES	<i>Arxula-Yeast Estrogen Screen</i>
ANA	Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AWWA	<i>American Water Works Association</i>
Ba	Bário
BDE/BDEs	Éteres difenílicos polibromados
BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BLYES	<i>Bioluminescence Yeast Estrogen Screen</i>
CALUX	<i>Chemical-Activated Luciferase Expression</i>
Cd	Cádmio
CEC	<i>Commission of the European Communities</i>
CESAMA	Companhia de Saneamento Municipal
CE50	Concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COV/COVs	Compostos orgânicos voláteis
CPR	<i>Chlorophenol red</i>
CPRG	<i>Chlorofenol red-β-D-galactopyranoside</i>
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DDE	Diclorodiflorofenil etileno
DDT	Diclorodifenil tricloroetano
DE	Desregulador(es) endócrino(s)
DES	Dietilestilbestrol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda química de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
ELL	Extração líquido-líquido
ERE	Elementos de resposta ao estrogênio
EQ-E2	Equivalente de 17 β -estradiol
ETA	Estação de tratamento de água
ETE/ETEs	Estação(ões) de tratamento de esgotos
GC	Cromatografia gasosa
GES	Gestodeno
HBCDD	Hexabromociclododecano
HBCD	Hexabromociclododecano

HCB	Hexaclorobenzeno
HPA/HPAs	Hidrocarboneto aromático policíclico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOP	Insuficiência ovariana primária
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
Kd	Coeficiente de sorção
Koc	Coeficiente de partição carbono orgânico-água
Kow	Fator de hidrofobicidade
LA	Lodos ativados
LAAP	Lodos ativados de aeração prologada
LAQUA	Laboratório de Qualidade Ambiental
LD	Limite de detecção
LES	Laboratório de Engenharia Sanitária
LNG	Levonorgestrel
LQ	Limite de quantificação
MMA	Ministério do Meio Ambiente
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
NP	Nonilfenol
NTK	Nitrogênio total <i>kjeldahl</i>
NO ₃ ⁻	Nitrato
OEDC	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
PAE/PAEs	Ftalatos ou ésteres ftalatos
Pb	Chumbo
PBB/PBBs	Bifenilapolibromadas
PBDE	Éter difenilpolibromado
PCB/PCBs	Policlorado de bifenilas
PCDD/PCDDs	Dibenzodioxinas policlorada
PCDD/Fs	Dibenzofuranos policlorados
PCDF	Dibenzofuranos policlorado
PFOA	Ácido perfluorooctanóico
PFOS	Ácido perfluorooctanossulfônico
PI	Índice ponderal
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
POP/POPs	Poluentes orgânicos persistentes
Q1	Primeiro quartil
Q2	Segundo quartil
RE/REs	Receptores endócrinos
RE α e RE β	Receptores de estrogênio
REh	Receptor estrogênico humano
SBR	Reator de bateladas sequenciais
SCCP	Parafinas cloradas de cadeia curta
SPE	Extração em fase sólida

SST	Sólidos suspensos totais
TDAH	Transtorno de déficit de atenção com hiperatividade
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UE	União Europeia
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VTG	Vitelogenina
WFD	<i>Water Framework Directive</i>
YES	<i>Yeast Estrogen Screen</i>
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	21
3.1.1 Definição	21
3.1.3 Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos	23
3.1.4 Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos	24
3.1.5 Atividade estrogênica	26
3.1.6 Compostos estrogênicos	26
3.1.5 Ocorrência de DE estrogênicos em matrizes ambientais	27
3.1.6 Efeitos causados pela exposição aos compostos estrogênicos	32
3.1.6.1 Efeitos em animais selvagens	32
3.1.6.2 Efeitos em seres humanos.....	35
3.1.7 Aspectos regulatórios para compostos estrogênicos.....	37
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA ..	39
3.3 BIOENSAIOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA	40
3.3.1 Ensaio <i>in vitro</i> <i>Yeast Estrogen Screen</i> (YES)	41
3.4 OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 COLETA.....	48
4.3 ENSAIO YEAST ESTROGEN SCREEN (YES)	51
4.3.1 Materiais e reagentes.....	52
4.3.2 Preparo das amostras e extração em fase sólida (SPE).....	53
4.3.3 Cultivo e conservação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
4.3.4 Procedimentos do ensaio YES	56
4.3.4 Teste de recuperação e limites de detecção e quantificação	59
4.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4.4.1 Atividade estrogênica	60

4.4.2 Parâmetros operacionais da ETE	63
4.4.3 Diluição do corpo hídrico receptor	64
4.4.4 Análise estatística	65
4.5 DESCARTE DE RESÍDUOS	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	67
5.2 ENSAIO YES	76
5.2.1 Avaliação qualitativa	76
5.2.2 Avaliação quantitativa	78
5.2.2.1 <i>Controle positivo 17β-estradiol</i>	78
5.2.2.2 <i>Inibição do crescimento da levedura Saccharomyces cerevisiae por toxicidade da amostra</i>	79
5.2.2.3 <i>Recuperação e limites de detecção e quantificação (LD e LQ)</i>	81
5.2.2.4 <i>Avaliação da atividade estrogênica</i>	82
5.2.2.5 <i>Correlação de Spearman entre os parâmetros físico-químicos e a atividade estrogênica</i>	88
5.2.2.6 <i>Avaliação dos efeitos potenciais a vida aquática</i>	88
6 CONCLUSÃO	89
APÊNDICE A – Estatística descritiva da caracterização físico-química das amostras de efluente bruto e tratado	113
APÊNDICE B – Teste de normalidade e de desvio dos parâmetros físico-químicos do efluente bruto nos períodos de chuva e de estiagem	114
APÊNDICE C – Teste de normalidade e de desvio dos parâmetros físico-químicos do efluente bruto e do efluente tratado	115
APÊNDICE D – Curva dose resposta de uma das amostras de branco	116
APÊNDICE E – Curva dose-resposta do controle-positivo de 17β-estradiol na faixa de concentração 2724 ng.L⁻¹ a 1,3301 ng.L⁻¹ (continua)	117
APÊNDICE F – Carta controle para o 17β-estradiol	119
APÊNDICE G – Curva da amostra de recuperação com concentração de 100 ng.L⁻¹ ..	120
APÊNDICE H - Estatística descritiva das concentrações de atividade estrogênica do efluente bruto e do efluente tratado	121
APÊNDICE I – Concentração de atividade estrogênica, mediana, LD e LQ de cada amostra de efluente bruto e de efluente tratado por coleta	122

APÊNDICE J – Teste de normalidade e de desvio atividade estrogênica para o efluente bruto e para o efluente tratado.....	123
APÊNDICE K – Estatística descritiva das concentrações de atividade estrogênica do efluente bruto nos períodos de chuva e de estiagem.....	124
ANEXO A - Materiais, equipamentos e reagentes necessários para o preparo das amostras, das soluções e para a realização do ensaio YES.....	125
ANEXO B – Preparo das soluções e do meio de análise para o ensaio YES.....	126

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência dos seres vivos está condicionada a qualidade e a quantidade de água no planeta Terra. Ainda que 71% do planeta seja coberto por água, somente 2,5% do total é composta por água doce (Rajasulochana e Preethy, 2016). A demanda por recursos hídricos é cada vez maior devido ao crescimento populacional e ao avanço da industrialização, associadas a degradação ambiental e as mudanças climáticas (Rathi *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo que as tecnologias de tratamento de efluentes evoluem, diversos compostos são lançados no meio ambiente e, cada vez mais, são produzidas novas substâncias químicas, mais resistentes e com efeitos adversos desconhecidos à saúde dos seres vivos, o que torna a poluição das águas um problema complexo (Kumar *et al.*, 2022). Diversos compostos químicos, como metais pesados, poluentes orgânicos persistentes (POPs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e compostos orgânicos voláteis (COVs) são poluentes emergentes de grande preocupação mundial (Zhao *et al.*, 2019).

Os desreguladores endócrinos (DE) integram o grupo dos microcontaminantes emergentes que, geralmente, não são sistematicamente monitorados no meio ambiente, mas que em baixas concentrações (ng.L^{-1} ou $\mu\text{g.L}^{-1}$), podem causar danos ao ecossistema em termos de saúde e qualidade de vida dos seres humanos e outros seres vivos (Enyoh *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2019). Os DE são capazes de danificar ou alterar diretamente um órgão endócrino e sua respectiva função, interferindo nas funções dos hormônios naturais e dos sistemas endócrinos de seres vivos, bloqueando ou imitando um hormônio natural ou por causa de seu comportamento/característica de modulação endócrina dentro do organismo (Ahmed *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2018; Jagne *et al.*, 2016; WHO, 2012).

Diversas substâncias são consideradas DE, como pesticidas, produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, hormônios, plastificantes, aditivos alimentares, conservantes de madeira, detergentes, surfactantes, desinfetantes, retardadores de chama, metais pesados, drogas ilícitas, entre outros compostos (Metcalf *et al.*, 2022; Rathi *et al.*, 2021). Os hormônios são excretados diariamente pelo corpo humano, sendo encontrados em efluentes de ETE e em águas superficiais no mundo todo. Os principais estrogênios naturais são o estrona (E1), o 17β -estradiol (E2) e o estriol (E3) e sintéticos, o dietilestilbestrol (DES) e o 17α -etinilestradiol (EE2) (Ahmed *et al.*, 2017; Kiyama e Wada-Kiyama, 2015).

O tratamento convencional de efluentes domésticos não objetiva a remoção de microcontaminantes, sendo essas substâncias lançadas juntamente com o efluente tratado nos

corpos hídricos receptores (Farré *et al.*, 2008; Pal, 2018; Yu *et al.*, 2019). É necessária a compreensão dos mecanismos de degradação desses compostos, para que seja possível focar em ações que contribuam para a melhoria e preservação da qualidade das águas. O ensaio *yeast estrogen screen* (YES) permite mensurar a atividade estrogênica total de uma mistura de substâncias (Routledge e Sumpter, 1996).

Sendo assim, na presente dissertação avaliou-se a ocorrência e remoção da atividade estrogênica em efluente sanitário tratado por lodos ativados com aeração prolongada (LAAP) por meio do ensaio *in vitro* YES.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de atividade estrogênica em efluente sanitário bruto e tratado e sua remoção em uma estação de tratamento de esgotos (ETE) com sistema de lodos ativados com aeração prolongada (LAAP) pelo ensaio *in vitro* YES.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade estrogênica em efluente sanitário bruto e do tratado;
- b) Avaliar a remoção da atividade estrogênica na ETE;
- c) Relacionar/Correlacionar a atividade estrogênica com os parâmetros operacionais e físico-químicos da ETE;
- d) Avaliar o desempenho da ETE de acordo com os parâmetros físico-químicos;
- e) Investigar a concentração de atividade estrogênica e o seu impacto após o descarte do efluente tratado no corpo hídrico receptor.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

3.1.1 Definição

O termo “desreguladores endócrinos” possui diversas traduções e definições. No inglês, “*endocrine disrupting chemicals*” pode ser traduzido como: desreguladores endócrinos, perturbadores endócrinos, interferentes endócrinos, disruptores endócrinos e interferentes hormonais; sendo os dois primeiros os mais utilizados.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United State Environmental Protection Agency* – USEPA), define o desregulador endócrino como “agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e ou comportamento dos organismos” (USEPA, 1997, tradução nossa).

Outros órgãos internacionais e autores adotam uma definição mais abrangente, como o Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety* - IPCS), juntamente com o Canadá, o Japão, os Estados Unidos (EUA), a Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico (*Organisation for Economic Co-operation and Development* - OEDC) e a União Europeia (UE), que definem um perturbador endócrino como “uma substância ou uma mistura de substâncias exógenas que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causam efeitos adversos sobre a saúde de um organismo intacto, sua descendência, e/ou (sub) populações” (CEC, 1999, tradução nossa).

A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO) adota uma definição mais ampla, onde define os desreguladores endócrinos como “substâncias ou misturas que causam alterações no sistema endócrino de seres vivos, podendo causar efeitos danosos à saúde, como afetar o crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento” (WHO, 2012, tradução nossa).

3.1.2 Histórico

Os primeiros estudos acerca dos efeitos dos desreguladores endócrinos não são novidade e ocorreram no início de 1900. Em 1938, Dodds *et al.* investigaram a atividade estrogênica de desreguladores endócrinos sintéticos e de misturas complexas com efeitos potenciais mais intensos devido a interação de seus subprodutos.

O dietilestilbestrol (DES) foi produzido pela primeira vez em 1938, e inicialmente, foi utilizado como droga veterinária em mamíferos (suínos e bovinos) para prevenir doenças como, câncer de mama e próstata (WHO, 2012). Entre os anos 1940 e 1970, o DES foi administrado a mulheres grávidas com o objetivo de reduzir o risco de abortos espontâneos (WHO, 2012). Nos anos 90, foi constatado que o fármaco estava ligado à incidência de um raro tipo de câncer de mama e no sistema reprodutor feminino de filhas cujas mães foram submetidas a tratamentos com o hormônio (Herbst, Ulfelder e Poskanzer, 1971). Em 1987, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a utilização deste hormônio na engorda do gado e atualmente ele não pode mais ser prescrito para mulheres grávidas. Nos dias atuais, o fármaco possui nova formulação e é indicado para o tratamento de câncer de mama (pós-menopausa) e de próstata metastáticos (APSEN, 2018).

Em 1996, Guillette *et al.* (1996) constataram a feminização dos jacarés expostos ao diclorodifeniltricloroetano (DDT) nos EUA. O DDT é um dos pesticidas de baixo custo mais conhecidos (CETESB, 2012). Este pesticida é considerado um POP devido à sua persistência (de cerca de 10 a 15 anos) e sua bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, ficando armazenado nos tecidos adiposos dos organismos vivos (Burgos-Aceves *et al.*, 2021; Umulisa *et al.*, 2020). O DDT foi banido nos anos 1970 e seu único uso legal autorizado é na pulverização residual interna para controlar mosquitos vetores de doenças, como dengue, malária, doença de Chagas, leishmaniose, tifo e febre amarela (Burgos-Aceves *et al.*, 2021; Gore *et al.*, 2015). No Brasil, a Portaria nº 357/1971, do Ministério da Agricultura, proíbe em todo o território nacional o uso de inseticidas organoclorados em controle de pragas em pastagens (Brasil, 1971).

Em 2001, na Convenção de Estocolmo, houve o reconhecimento da toxicidade dos POPs e 150 países o firmaram compromisso com o objetivo de restringir os POPs a partir de 2004. O Brasil firmou sua participação na Convenção de Estocolmo e compromissos a partir da publicação do Decreto Executivo nº 5.472/2005 (Brasil, 2005). Mesmo após o banimento

ou restrição de alguns POPs, estes compostos uma vez introduzidos no meio ambiente permanecem por muitos anos, devido à sua persistência e bioacumulação.

Em 2002, o IPCS, um programa conjunto da WHO, Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e a Organização Internacional do Trabalho, concluíram que havia a necessidade de aumentar as pesquisas acerca de DEs, uma vez que já haviam evidências sobre os efeitos desses compostos em animais selvagens e em seres humanos, principalmente sobre a incerteza dos efeitos adversos durante os primeiros estágios da vida (Demonel, Santos e Vicente, 2022). Desde então, pesquisas dos efeitos em seres selvagens e em seres humanos associados ao interferentes endócrinos se intensificaram juntamente com a descoberta de novos métodos de determinação de DE e sua otimização.

3.1.3 Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos

Diversos compostos pertencem a classe dos DE, como: ftalatos, alquilfenóis, organoclorados, bisfenol A (BPA), parabenos, HPAs, metais pesados, pesticidas, compostos orgânicos de estanho, PCBs, retardantes de chama bromados, fitoestrogênios, agentes terapêuticos, fármacos e hormônios naturais e sintéticos, drogas ilícitas (Bila e Dezotti, 2007; Metcalfe *et al.*, 2022), entre outros. A classificação dos DE, e seus respectivos exemplos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação e exemplos de desreguladores endócrinos (continua).

Classificação	Exemplos específicos de desreguladores endócrinos
Compostos halogenados persistentes e bioacumulativos	
Dioxinas	Dibenzodioxinas policloradas (PCDDs), hexaclorobenzeno (HCB), ácido perfluorooctanosulfônico (PFOS), éter difenilpolibromado (PBDE), bifenilapolibromadas (PBBs), toxafeno, diclorodifeniltricloroetano (DDT), diclorodiclorofenil etileno (DDE), lindano, endosulfan, hexabromociclododecano (HBCDD), parafinas cloradas de cadeia curta (SCCP), ácido perfluorooctanóico (PFOA), octaclorostireno, bifenilapolicloradametilsulfonas.
Furanos	Dibenzofuranos policlorados (PCDF)
Bifenilas	Bifenilapolicloradas (PCBs)
Compostos pouco persistentes e pouco bioacumulativos	
Compostos aromáticos	Ésteres ftalatos, n-butilbenzeno, triclocarban, hidroxinisolabutilada.
Compostos aromáticos policíclicos	Benzopireno, benzoantraceno, pireno, antraceno.
Compostos fenólicos halogenados	2,4-Diclorofenol, pentaclorofenol, hidroxí-PCBs, hidroxí-PBDE, tetrabromobisfenol-A, 2,4,6-tribromofenol, triclosan.
Compostos fenólicos não-halogenados	Bisfenol A, bisfenol F, bisfenol S, nonilfenol, octilfenol, resorcinol.

Tabela 1 – Classificação e exemplos de desreguladores endócrinos (continuação).

Pesticidas, produtos farmacêuticos e ingredientes de produtos para cuidados pessoais	
Pesticidas	2,4-D, atrazina, carbaril, malatião, mancozebe, vinclozolina, procloraz, procimidona, clorpirifós, fenitrotiona, linuron.
Compostos farmacêuticos, hormônios de crescimento e ingredientes de produtos de higiene pessoal	Dietilestilbestrol, etinilestradiol, tamoxifeno, levonorgestrel, inibidores seletivos de serotonina, flutamida, 4-metilbenzilidenocânfora, 3-metilbenzilidenocânfora, octil-metoxicinamato, parabenos, metil siloxanoscíclicos, galaxolida.
Outros compostos	
Metais e compostos organometálicos	Arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio, metilmercúrio, tributiltina, trifeniltina.
Hormônios naturais	17 β -estradiol, estrona, testosterona.
Fitoestrógenos	Isoflavonas (genisteína, daidzeína), micotoxinas (zearalenona), flavonoidesprenilados.

3.1.4 Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos

O sistema endócrino é responsável pela regulação dos processos vitais para a vida de um organismo, como crescimento, reprodução, manutenção, homeostase e metabolismo (Cole *et al.*, 2019; Kasonga, 2021). Ele é composto por um conjunto de glândulas que produzem e secretam hormônios diretamente no sangue para regular diversas funções corporais (WHO, 2012). Os hormônios são definidos como moléculas produzidas por glândulas endócrinas, e que então circulam através do sangue para produzir estímulos em órgãos específicos. A produção de hormônios em grandes quantidades ou a sua escassez pode resultar em doenças.

Cada hormônio possui um receptor endócrino (RE) correspondente, conhecido popularmente como sistema “chave-fechadura”. A ação hormonal é determinada pela presença do receptor nas células-alvo e pela ativação por meio da ligação do hormônio ao receptor endócrino. A quantidade de hormônios produzidos e liberados, o seu transporte via circulação sanguínea, sua potência e por quanto tempo podem ativar o seu respectivo RE são propriedades que interferem na sinalização hormonal (Gore *et al.*, 2014).

Os DE podem ser androgênicos, estrogênicos, tireoideanos ou corticoides. Nas matrizes ambientais é observada uma mistura complexa de diferentes DE, e isso pode causar efeitos cumulativos ou sinérgicos (Defarge *et al.*, 2018; Vandenberg *et al.*, 2017). As misturas podem ter efeitos mais ou menos potentes que os compostos individuais e os compostos podem atuar por diferentes e múltiplos mecanismos de ação, o que torna difícil a previsão de seus efeitos (Defarge *et al.*, 2018; Lee e Jacobs, 2019; Vandenberg *et al.*, 2017). O resumo dos principais mecanismos de ação de DE e suas respectivas definições apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Diferentes mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos na saúde humana.

Tipo de mecanismo	Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos (DE) na saúde humana
<u>Mecanismo 1:</u> os DE exibindo atividade hormonal através da ligação ao receptor levando à ativação de suas vias de sinalização (agonista).	É o mecanismo de atuação da maioria dos DE. Eles podem atuar como hormônios, interagindo diretamente e ativando os receptores hormonais, e podem ser degradados com menos eficiência do que os hormônios naturais, e são mais ativos <i>in vivo</i> devido à sua meia-vida mais longa nas células sanguíneas.
<u>Mecanismo 2:</u> os DE ligam-se aos receptores, inibindo a ação do hormônio endógeno através da ocupação do receptor (antagonista).	Os DE se assemelham a hormônios e se ligam a receptores, congelando a conformação dos receptores em seu estado inativo e <u>antagonizando</u> as ações de hormônios endógenos, e as moléculas exógenas podem exercer claramente a desregulação endócrina.
<u>Mecanismo 3:</u> DE interagem com os componentes das vias de sinalização hormonal a jusante do receptor.	Os DE não interferem diretamente nos receptores, mas nos componentes da via de sinalização hormonal, o que pode ser difícil de identificar. Esse mecanismo pode levar a efeitos diretos, não-endócrinos e tóxicos.
<u>Mecanismo 4:</u> Estimulação	Os DE não interferem diretamente nos receptores, mas afetam, negativa ou positivamente, a biossíntese de hormônios endógenos. Esses DE têm estruturas diferentes dos hormônios endógenos e não competem com eles.
<u>Mecanismo 5:</u> Inibição	Os DE não interferem diretamente nos receptores, mas, ao afetarem a concentração endógena de hormônios, impactam na sua degradação. Esses DE têm estruturas diferentes dos hormônios endógenos e não competem com os eles.
<u>Mecanismo 6:</u> Ligação à proteína de ligação ao hormônio circulante.	Os DE hidrofóbicos competem com pequenos hormônios hidrofóbicos (como tireoides e esteróides) por essas proteínas de transporte no sangue. Assim, competem com a concentração de hormônios endógenos no sangue.
<u>Mecanismo 7:</u> Estimulação ou inibição da degradação ou síntese de proteínas de ligação a hormônios.	Os DE interferem na biossíntese/degradação de proteínas transportadoras de ligação a hormônios, que podem afetar tanto a "concentração total de hormônios" e/ou "sua fração ativa livre associada". Desta forma, os DE apresentam uma estrutura química diferente da dos hormônios. Então, as proteínas de transporte de ligação a hormônios são frequentemente degradadas ou sintetizadas pelo fígado, que, como órgão degradador, é o principal alvo dos tóxicos.
<u>Mecanismo 8:</u> DE que afetam a ativação do receptor de hormônio endógeno: Simulação.	Simulação de um receptor hormonal endógeno, interferindo na homeostase endócrina.
<u>Mecanismo 9:</u> DE que afetam a ativação do receptor de hormônio endógeno: Inibição.	Nesse mecanismo, os DE não precisam se assemelhar a hormônios para exercer seu efeito adverso pela disponibilidade de um receptor modificador, enquanto a síntese e/ou degradação do receptor é frequentemente controlada por seus hormônios cognatos.

Fonte: Adaptado de Combarous e Nguyen (2019).

Os principais mecanismos de ação são a mimetização, bloqueio, depleção, estimulação, inibição e destruição (Combarrous e Nguyen, 2019; Klančič, Globec e Jakopin *et al.*, 2022). O mecanismo mais estudado é a interação hormonal via receptores esteroides (agonista ou antagonista), uma vez que estes são os mais associados aos distúrbios reprodutivos em baixas concentrações.

Existem alguns fatores que podem interferir nos efeitos causados pelos DE, como a persistência, a bioacumulação, a exposição durante a gravidez, hereditariedade, interação de diferentes DE em uma mistura e os múltiplos caminhos de ação (Bila, 2005).

3.1.5 Atividade estrogênica

Estrogênio é a definição utilizada para o conjunto de hormônios femininos naturais, que promovem a multiplicação celular, atuando na regulação do ciclo menstrual e no espessamento do endométrio a cada ciclo menstrual para possibilitar a implantação do embrião no útero no estágio inicial da gravidez (Adeel *et al.*, 2017).

Os estrogênios e os xenoestrogênios são hormônios esteroides com a capacidade de se ligar e ativar os receptores de estrogênio (RE α e RE β) (Varticovski *et al.*, 2022). Esses receptores regulam diversas funções corporais, como mineralização óssea, imunidade, reprodução feminina e masculina, metabolismo e outros processos biológicos vitais (Hamilton *et al.*, 2017). Nos ensaios para detecção/quantificação da atividade estrogênica, a potência estrogênica relativa de uma substância é comparada com o estrogênio padrão humano, o E2, que representa a referência pela qual a atividade estrogênica é medida (Bila, 2005).

3.1.6 Compostos estrogênicos

Os hormônios são excretados diariamente pelo corpo humano, sendo encontrados em efluentes de ETE e águas superficiais no mundo todo. Os principais estrogênios naturais são a estrona (E1), o 17 β -estradiol (E2) e o estriol (E3) e sintéticos, o dietilestilbestrol (DES) e o 17 α -etinilestradiol (EE2) (Ahmed *et al.*, 2017; Kiyama e Wada-Kiyama, 2015).

Os contraceptivos são fármacos utilizados na prevenção da gravidez e para controle hormonal. Eles são medicamentos combinados contendo um estrogênio e um progestágeno, geralmente EE2 e levonorgestrel (LNG) ou gestodeno (GES), respectivamente (Fent, Chew e Gomez, 2015; King *et al.*, 2016). O EE2 é o principal componente ativo da maioria dos

contraceptivos orais e dos fármacos de terapia de reposição hormonal. Ele possui alta potência estrogênica e é muito resistente à biodegradação nos processos de tratamento empregados nas ETEs (Hamid e Eskicioglu, 2012).

Existem diversas substâncias sintéticas que podem ativar ou inibir diretamente ou indiretamente a ação dos estrogênios, como os fármacos DES e EE2, além de outros produtos químicos variados, como os plastificantes, produtos de degradação de surfactantes não-iônicos, ftalatos, alguns pesticidas, compostos fenólicos, entre outros (Kiyama e Wada-Kiyama, 2015). O BPA e o seu substituto, bisfenol AF (BPAF), são exemplos de compostos estrogênicos menos potentes que os hormônios (Huang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012). Alguns metais, como cádmio (Cd), chumbo (Pb), bário (Ba), cromo (Cr), cobre (Cu) e zinco (Zn), também exibem atividades estrogênicas (Zhang *et al.*, 2019).

3.1.5 Ocorrência de DE estrogênicos em matrizes ambientais

Os DE estão presentes em diversas matrizes ambientais, como efluentes domésticos e industriais, lodo de esgoto, águas superficiais e subterrâneas, água potável, sedimentos, solos, dentre outros (Huang, Karu e Campos, 2021).

Os hormônios são excretados pelo corpo humano através da urina e das fezes, sendo os hormônios esteróides endógenos os principais compostos presentes nos esgotos domésticos e causadores da maior parte da atividade estrogênica (Konemann *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2015). Estima-se que os hormônios naturais e sintéticos contribuam com cerca de 80% da estrogenicidade presente no esgoto (Gavrilescu *et al.*, 2014; Gorga *et al.*, 2014). Contudo, existem outros compostos presentes, que não foram totalmente identificados que também contribuem para tal efeito (Černá *et al.*, 2022).

Os microcontaminantes, geralmente, não são degradados completamente pelos processos de tratamento convencional de efluentes sanitários (Farré *et al.*, 2008; Pal, 2018). Assim, o lodo contém a maioria dos poluentes hidrofóbicos presentes nos efluentes, bem como uma fração substancial de poluentes hidrofílicos que não foram transformados durante o processo de tratamento (Christodoulou e Stamatelatou, 2015; Gonzalez-Gil *et al.*, 2016; Yost *et al.*, 2014). Assim, a aplicação de dejetos animais, efluentes sanitários tratados e biossólido (lodos de esgoto tratados) no solo objetivando melhorar sua estrutura física e fertilidade introduzem no solo substâncias DE, principalmente hormônios naturais (Adeel *et al.*, 2017; Goeppert *et al.*, 2014). As plantas podem absorver e acumular esses compostos, representando

risco à saúde dos seres vivos através da ingestão de alimentos e água contaminados (Gosh e Sahu, 2022; Healy *et al.*, 2017).

Embora existam muitos estudos acerca da toxicidade e estrogenicidade de DE em efluentes domésticos, poucas pesquisas aplicam bioensaios em lodo (Papa *et al.*, 2022). Gonzalez-Gil *et al.* (2016) explicam que o principal motivo para tal se deve a limitações analíticas dos bioensaios. Werle e Sobek (2019), também relatam que as regulamentações de uso do lodo na agricultura focam apenas em alguns parâmetros químicos específicos, como metais pesados e pesticidas e microbiológicos (patógenos), com poucas considerações da avaliação dos efeitos deletérios.

Nas Tabela 3 e 4 apresentam-se estudos sobre a ocorrência de DE estrogênicos em águas superficiais e em efluentes domésticos no Brasil nos últimos anos.

Tabela 3 – Ocorrência de compostos estrogênicos em corpos hídricos superficiais no Brasil (continua).

Composto (Classe)	Concentração máxima (ng.L ⁻¹)	Localidade/Estado	Referência
E2	5,60	Recife/PE	(De Melo <i>et al.</i> 2021)
	900	SP	(Coelho <i>et al.</i> , 2020)
	216,67	Ouro Preto/MG	(França <i>et al.</i> , 2020)
	57	SP	(Martini, 2021)
	6.000	Campinas/SP	(Ghiselli, 2006)
	14,80	São Carlos/SP	(Campanha <i>et al.</i> , 2014)
	72,85	Nova Lima/MG	
	31	Nova Iguaçu/RJ	(Dias, 2014)
	85,02	São Paulo/SP	
	7.350	Curitiba/PR	(Padilha e Leitzke, 2013)
	5,69	Caratinga/MG	(Sansón, 2012)
	6.806	Campinas/SP	(Montagner e Jardim, 2011)
	25,80	Jaboticabal/SP	(Lopes <i>et al.</i> , 2010)
	E1	77	SP
42,60		Belém/PA	(Teixeira <i>et al.</i> , 2021)
16		Recife/PE	(De Melo, 2021)
28,70		São Paulo/SP	(Sousa <i>et al.</i> , 2018)
256,66		Ouro Preto/MG	(Weber <i>et al.</i> , 2017)
58,50		São Carlos/SP	(Campanha <i>et al.</i> , 2014)
3,20		Rio Doce/MG	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2014)
36,28		Nova Lima/MG	(Dias, 2014)
78,05		Nova Iguaçu/RJ	
17,40		São Paulo/SP	(Padilha e Leitzke, 2013)
2.420		Curitiba/PR	

Tabela 4 – Ocorrência de compostos estrogênicos em corpos hídricos superficiais no Brasil (continuação).

Composto	Concentração máxima (ng.L ⁻¹)	Localidade/Estado	Referência	
E1	8,60	Goiânia/GO	(Fonseca, 2013)	
	15,87	Caratinga/MG	(Sansón, 2012)	
	600	Jaboticabal/SP	(Lopes <i>et al.</i> , 2010)	
	5.000	Campinas/SP	(Ghiselli, 2006)	
EE2	14	Recife/PE	(De Melo <i>et al.</i> , 2021)	
	68	SP	(Martini, 2021)	
	113,90	Belém/PA	(Teixeira <i>et al.</i> , 2021)	
	630	SP	(Coelho <i>et al.</i> , 2020)	
	48,60	Sorocaba/SP	(França <i>et al.</i> , 2020)	
	3.500	Campinas/SP	(Ghiselli, 2006)	
	4.390	Campinas/SP	(Montagner e Jardim, 2011)	
	38,50	MS	(Sposito <i>et al.</i> , 2018)	
	0,53	Rio Doce/MG	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2014)	
	236,63	Nova Iguaçu/RJ		
	138,16	São Paulo/SP	(Dias, 2014)	
E3	45,33	Nova Lima/MG		
	9.520	Curitiba/PR	(Padilha e Leitzke, 2013)	
	24	Recife/PE	(De Melo <i>et al.</i> , 2021)	
	224	SP	(Martini, 2021)	
	11,90	MS	(Sposito <i>et al.</i> , 2018)	
	211,50	Ouro Preto/MG	(Weber <i>et al.</i> , 2017)	
	67,39	Nova Lima/MG		
	15,81	São Paulo/SP	(Dias, 2014)	
	Progesterona	530	Curitiba/PR	(Goulart, 2017)
		195	Campinas/SP	(Montagner e Jardim, 2011)
BPA	52	Recife/PE	(De Melo, 2021)	
	517	Novo Hamburgo/RS	(Peteffi <i>et al.</i> , 2019)	
	48,70	MS	(SPOSITO <i>et al.</i> , 2018)	
	198,66	Ouro Preto/MG	(Weber, 2017)	
	75,34	Rio Doce/MG	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2014)	
	308,56	Nova Lima/MG		
	652,01	Nova Iguaçu/RJ	(Dias, 2014)	
	103,52	São Paulo/SP		
	13.016	Campinas/SP	(Montagner e Jardim, 2011)	
NP	645,01	Ouro Preto/MG	(Weber <i>et al.</i> , 2017)	

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: 17 α -etinilestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2), bisfenol (BPA), estrona (E1), E3 (estriol), Goiás (GO), limite de detecção (LD), nonilfenol (NP), Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS), Pernambuco (PE), Pará (PA), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP).

Tabela 4 – Ocorrência de compostos estrogênicos em estações de tratamento de efluentes domésticos no Brasil.

Composto	Concentração máxima no esgoto bruto (ng.L ⁻¹)	Concentração máxima no esgoto tratado (ng.L ⁻¹)	Localidade/ Estado	Referência
E2	< LD	< LD	Belo Horizonte/MG	(Komolafe <i>et al.</i> , 2021)
	7.434	4.191	EEL/USP – Lorena/SP	(Teixeira <i>et al.</i> , 2016)
	776	397	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2014)
	1,24	0,34	Ilha do Governador/RJ	(Ferreira, 2013)
	1,11	0,23	Penha/RJ	
	2.520	1.240	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2012)
	31	<9,3	Belo Horizonte/MG	(Queiroz <i>et al.</i> , 2012)
	2.270	760	Curitiba/PR	(Froehner <i>et al.</i> , 2011)
	7.400	4.000	Fortaleza/CE	(Souza, 2011)
	300	54	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2011)
6.690	5.560	Campinas/SP	(Ghiselli, 2006)	
E1	77,8	16	Belo Horizonte/MG	(Komolafe <i>et al.</i> , 2021)
	5.148	5.062	EEL/USP – Lorena/SP	(Teixeira <i>et al.</i> , 2016)
	3.050	2.080	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2014)
	2.570	2.080	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2012)
	1.380	<LD	Curitiba/PR	(Froehner <i>et al.</i> , 2011)
	4.350	4.350	Fortaleza/CE	(Souza, 2011)
	560	280	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2011)
	4.830	4.130	Campinas/SP	(Ghiselli, 2006)
EE2	5.688	2.550	EEL/USP – Lorena/SP	(Teixeira <i>et al.</i> , 2016)
	3.180	176	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2014)
	<41,3	<12,4	Belo Horizonte/MG	(Queiroz <i>et al.</i> , 2012)
	1.260	470	Curitiba/PR	(Froehner <i>et al.</i> , 2011)
	5.230	1.200	Fortaleza/CE	(Souza, 2011)
	1.380	1.000	Fortaleza/CE	(Pessoa <i>et al.</i> , 2011)
	5.810	5.040	Campinas/SP	(Ghiselli, 2006)
E3	1.547,9	64,3	Belo Horizonte/MG	(Komolafe <i>et al.</i> , 2021)
	5.200	7.743	EEL/USP – Lorena/SP	(Teixeira <i>et al.</i> , 2016)
BPA	1.544.000	820.000	Belo Horizonte/MG	(Floripes <i>et al.</i> , 2018)
	165	-	Belo Horizonte/MG	(Queiroz <i>et al.</i> , 2014)
	2.770	670	Ilha do Governador/RJ	(Ferreira, 2013)
	5.310	1.790	Penha/RJ	
	308,8	751	Belo Horizonte/MG	(Queiroz <i>et al.</i> , 2012)
	84.110	20	Curitiba/PR	(Froehner <i>et al.</i> , 2011)
	8.700	7.900	Belo Horizonte/MG	(Sodré, Locatelli e Jardim, 2010)
NP	1.870	1.390	Campinas/SP	(Montagner, 2007)
Progesterona	3.570	2.930	Campinas/SP	(Ghiselli, 2006)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: 17 β -estradiol (E2), estrona (E1), 17 α -etinilestradiol (EE2), E3 (estriol), bisfenol A (BPA), nonilfenol (NP), limite de detecção (LD).

Como pode ser visto nas Tabelas 3 e 4, são reportados diversos compostos, principalmente os hormônios naturais e sintéticos. Observa-se que as concentrações dos compostos variam muito, pois juntamente com o esgoto, sofrem a influência de diversos fatores, como densidade populacional e seu estilo de vida, condições de saneamento básico e

tratamento de esgoto, variações sazonais, espaciais e temporais. Cabe ressaltar que a exposição a microncontaminantes em geral também está relacionada à fatores socioeconômicos. A população pobre está mais propensa a exposição à microcontaminantes devido ao ar e água contaminados, saneamento básico precário, locais insalubres de trabalho, dentre outras fontes e vias e de exposição (Fiscella *et al.*, 2000).

3.1.6 Efeitos causados pela exposição aos compostos estrogênicos

3.1.6.1 Efeitos em animais selvagens

Afinamento e eclosão de ovos de aves, feminização e anomalias em peixes e moluscos, distúrbios reprodutivos em répteis, mamíferos e anfíbios são os efeitos mais relatados associados aos compostos estrogênicos, resultando na redução da capacidade reprodutiva e o conseqüente declínio populacional (Bouwman *et al.*, 2019; Kamata *et al.*, 2020; Migliaccio *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2020; Usal *et al.*, 2021; Verderame *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2019). O resumo dos principais distúrbios em animais associados as suas respectivas substâncias estrogênicas encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Efeitos atribuídos aos compostos estrogênicos em animais selvagens (continua).

Classes	Contaminante	Efeitos	Referência
Mamíferos	BPA	Risco de ovário policístico em ratos fêmeas	(Yang <i>et al.</i> , 2019)
		Tempo alterado da puberdade, ciclos estrais alterados, alterações da próstata, desenvolvimento alterado da glândula mamária, alterações no útero e ovário, alternâncias nos dimorfismos sexuais cerebrais, alterações nos níveis de receptores de esteroides cerebrais, comportamento sociosexual alterado, alterações corporais peso e alteração da homeostase da glicose em ratos.	(Rubin, 2011)
		Aumento da expressão de fatores relacionados à apoptose, citocromo C e indicadores apoptóticos em células espermatogênicas, o que afeta o sistema reprodutor em ratos machos.	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
		Apoptose de células ovarianas e interrupção do sistema reprodutivo em ratos fêmeas.	(Lee <i>et al.</i> , 2013)
	EE2	Filhotes menores e alteração no crescimento do índice ponderal (IP).	(Vosges <i>et al.</i> , 2008)
		Em ratos grávidas afetou significativamente o desenvolvimento do embrião em retardou o seu crescimento.	(Pillon <i>et al.</i> , 2012)
		Diminuição do peso corporal, alteração do ciclo estral, aceleração da abertura vaginal, aumento das lesões uterinas e da distância anogenital em ratos fêmeas jovens.	(Delclos <i>et al.</i> , 2009)
		Interrompimento do rato reprodutivo de ratos machos.	(Larcher <i>et al.</i> , 2012)
Réptil	E2, BPA, endosulfan e atrazina	Alterações nas gônadas e na dinâmica folicular em fêmeas.	(Stoker <i>et al.</i> , 2008)
	NP	Indução da síntese de vitelogenina (VTG) em machos.	(Verderame <i>et al.</i> , 2011)
Anfíbios	BPA	Maturidade sexual atrasada, metabóloma oocitário alterado e não produziu descendentesaturidade sexual atrasada, metabóloma oocitário alterado e não produziu descendentes.	(Usal <i>et al.</i> , 2021)
	DEs estrogênicos	Proporções de sexo feminino dominante.	(Lambert <i>et al.</i> , 2015)
	E2 e 4-terc-octilfenol	Alteração no comportamento sexual em machos.	(Schwendiman e Propper, 2012)
	EE2	Feminização de machos.	(Tamschick <i>et al.</i> , 2016)
	NP	Interferência na atividade da glândula adrenal.	(Capaldo <i>et al.</i> , 2012)
	Octilfenol	Feminização de machos	(Porter <i>et al.</i> , 2011)

Tabela 5 – Efeitos atribuídos aos compostos estrogênicos em animais selvagens (continuação).

Classes	Contaminante	Efeitos	Referência
Peixes	BPA, NP e E2	Efeitos na expressão do gene GnRH e no desenvolvimento embrionário.	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
	BPA	Retração e redução da taxa de fertilidade e sobrevivência da prole em peixes-zebra.	(Akhter <i>et al.</i> , 2018)
		Redução da população de espermatozoides e apoptose, bem como interrupção da progressão meiótica em peixes-zebra.	(González-Rojo <i>et al.</i> , 2019)
		Toxicidade epigenética e distúrbios reprodutivos em peixes-zebra.	(Laing <i>et al.</i> , 2016)
	E2, DES e NP	Indução da síntese de VTG e redução dos testículos.	(Jin <i>et al.</i> , 2012)
	E2	Indução a síntese de VTG e alterações gonadais em peixes machos.	(Sol <i>et al.</i> , 2019)
	EE2	Feminização dos machos, intersex, distúrbios reprodutivos e colapso da população em peixes-zebra.	(Chen <i>et al.</i> , 2010; Duong <i>et al.</i> , 2010; Liu <i>et al.</i> , 2011)
		Diminuição da produção de óvulos e espermatozoides; redução da qualidade dos gametas, fertilidade e fecundidade, com alterações comportamentais e aumento de VTG em peixes machos e fêmeas e proporções de peixes intersexuais em peixes-zebra.	(Colman <i>et al.</i> , 2009; Schafers <i>et al.</i> , 2007; Silva <i>et al.</i> , 2012; Soares <i>et al.</i> , 2009; Yan <i>et al.</i> , 2012)
		Correlação entre a exposição a EE2 e a interrupção dos sistemas reprodutivos em peixes-zebra.	(Aydin e Talinili, 2013; Xu <i>et al.</i> , 2008)
	E2 e EE2	Alta taxa de mortalidade e atraso significativo no desenvolvimento de tilápias, produção de indivíduos intersexuais, desenvolvimento de anomalias morfológicas.	(Neto, Santos e Mota, 2022)
	Efluente doméstico	Indução à síntese de VTG.	(Song <i>et al.</i> , 2022)
	Levonogestrel	Imposex em peixes fêmeas.	(Runnalls <i>et al.</i> , 2013)
	4-NP	Interferência no desenvolvimento embrionário.	(Chandrasekar <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: 17 α -etinilestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2), bisfenol A (BPA), desreguladores endócrinos (DE), dietilestilbestrol (DES), nonilfenol (NP) e receptores androgênicos (RAs)

3.1.6.2 Efeitos em seres humanos

Em países desenvolvidos, muitas pesquisas apontam que a saúde reprodutiva dos homens está em declínio (Swan e Colino, 2022; Vander Borgh e Wyns, 2018). Criptorquidia, hipospádia, câncer testicular, diminuição dos níveis de testosterona e diminuição do número e da qualidade dos espermatozoides são os distúrbios mais frequentes. Delbes *et al.* (2022) apontam que dentre os fatores que podem aumentar essas anormalidades está a exposição aos DE durante a gestação (Skakkebæk *et al.*, 2015).

No mundo todo, estima-se que muitas mulheres estão sofrendo de menopausa precoce (12,2%) e insuficiência ovariana primária (IOP) (3,7%) (Golezar *et al.*, 2019). Entre 2007 e 2017, aumentou-se em 1,45% a incidência global de ovários policísticos (Liu *et al.*, 2021), afetando de 5% a 20% das mulheres em idade reprodutiva (Azziz *et al.*, 2016). Esses, dentre outros distúrbios reprodutivos contribuem para a infertilidade feminina. Assim como, na população masculina, a disgenia ovariana aponta que muitos dos distúrbios reprodutivos se deve à exposição à DEs in útero (Delbes *et al.*, 2022; Johansson *et al.*, 2017). O resumo dos principais distúrbios em seres humanos e seus respectivos DE estrogênicos associados apresenta-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Efeitos atribuídos aos compostos estrogênicos em seres humanos.

Contaminante	Efeitos	Referência
EE2	Câncer de próstata em homens.	(Teske e Arnold, 2008)
	Baixo neurodesenvolvimento específico do sexo, câncer uterino, imunotoxicidade, neurotoxicidade e interferência nas vias celulares.	(ShafeI <i>et al.</i> , 2018; Watkins <i>et al.</i> , 2017)
	Risco de diabetes, doenças cardiovasculares, abortos recorrentes e aumento do número de partos prematuros e diminuição da qualidade do sêmen e do esperma.	(Ma ´cczak <i>et al.</i> , 2016)
	Aumento do peso da próstata, alterações no desenvolvimento da função cerebral, interrupção do desenvolvimento dos órgãos reprodutivos e interrupção da excreção de testosterona e produção de esperma.	(Rubin, 2011)
BPA	Defeitos de desenvolvimento dos sistemas urogenitais masculino e feminino, perturbações nos níveis de hormônios sexuais e várias síndromes com tendência a diminuir a fertilidade .	(Matuszczak <i>et al.</i> , 2019; Santoro <i>et al.</i> , 2019)
	Redução de oócitos maduros e fertilizados, probabilidade reduzida de fertilização e resposta ovariana, baixo pico de 17β-estradiol (E2), aumento infertilidade.	(Bloom <i>et al.</i> , 2011; Ehrlich <i>et al.</i> , 2012)
	Criptorquidismo em homens.	(Chevalier <i>et al.</i> , 2015)
	Diminuição da concentração de esperma.	(Li <i>et al.</i> , 2011)
	Aumento do risco de aborto aneuploide e euploide.	(Lathi <i>et al.</i> , 2014)
	Diminuição do peso ao nascer e restrição do crescimento fetal.	(Troisi <i>et al.</i> , 2014)
BPA, NP e E2	Efeitos na expressão do gene GnRH e no desenvolvimento embrionário.	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
	Diminuição da capacidade reprodutiva, infertilidade, criptorquidismo, menopausa precoce e câncer de mama, câncer de próstata e de útero.	(Mclachlan, 1977)
DES	Aumento do risco de TDAH na segunda e terceira geração.	(Kioumourtzoglou <i>et al.</i> , 2018)
	Alta incidência de defeitos uterinos, especialmente útero aplástico, na segunda e terceira geração.	(Wautier <i>et al.</i> , 2020)
	Aumento de três vezes no risco de câncer testicular.	(Hom <i>et al.</i> , 2019)
Metais pesados	Impacto negativo a longo prazo no volume de sêmen e na contagem de espermatozoides após exposição in útero.	(Istvan <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: 17α-etinilestradiol (EE2), 17β-estradiol (E2), bisfenol A (BPA), dietilestilbestrol (DES) e nonilfenol (NP).

3.1.7 Aspectos regulatórios para compostos estrogênicos

No Brasil, os padrões de qualidade dos corpos hídricos são orientados pela Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (Brasil, 2005). Ela dispõe sobre a classificação dos corpos de água superficiais e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Esta resolução foi complementada pela Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 (Brasil, 2011), que estabelece as condições, parâmetros e padrões de lançamento de efluentes. A definição da classificação e de diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas é dada pela Resolução CONAMA nº 396, de 3 de abril de 2008 (Brasil, 2008). Nessas resoluções não há limites e padrões de lançamento para compostos listados especificamente devido aos seus potenciais efeitos estrogênicos, bem como de desregulação endócrina, em geral.

Existe também a Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde 888, de 4 de maio de 2021 (Brasil, 2021), publicada a partir da revisão do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde (antiga Portaria MS nº 2914/2011). Ela dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Na Portaria existe o estabelecimento dos valores-limite para algumas substâncias consideradas DE, como alguns agrotóxicos e metais pesados. Elaborou-se um relatório técnico que contou com a participação de pesquisadores da UFJF, UFOP e UFV (Brandt, Aquino e Bastos, 2020), com a finalidade de incluir no padrão de potabilidade diversas substâncias de preocupação emergente. No relatório consta a seleção de diversas substâncias com potencial risco à saúde humana, dentre as quais se encontram os DE estrogênicos E1, E2, E3, EE2 e DES. Entretanto, na revisão do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5/2017 decidiu-se por não incluir nenhum dos compostos estrogênicos, assim como os demais DE na nova portaria de potabilidade de água do Brasil.

No âmbito internacional, alguns países têm mostrado preocupação com os DE estrogênicos, como a UE, os EUA e a Austrália, incluindo alguns desses compostos em seus programas de monitoramento de qualidade da água.

Devido ao aumento das evidências acerca dos efeitos potenciais associados aos DE, em 1999, a Comissão Europeia adotou a Estratégia Comunitária de Desreguladores Endócrinos. Em 2015, foram incorporadas a primeira lista de vigilância (*Ist Watch list*) 10 substâncias ou grupos de compostos emergentes, dentre os quais se encontravam o E1, E2, EE2. Adiante, em junho de 2018, foram estabelecidos os VMPs de detecção para o

monitoramento em águas superficiais, de 0,4 ng.L⁻¹ para E1 e E2 e 0,035 ng.L⁻¹ para o EE2. Em 2020, foram incluídos na *Watch list* relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, o BPA, com VMP de 2,5 µg.L⁻¹ e os compostos os compostos E2 e NP, com base no monitoramento das águas superficiais realizado desde 2015 e em dados de saúde pública (Diretiva 2020/2184).

A Austrália possui um guia de potabilidade para reuso de água para abastecimento humano (*Australian Guidelines for Water Recycling – Argumentation of Drinking Water Supplies*), no qual encontram-se alguns VMPs para compostos estrogênicos baseados em riscos à saúde humana, dentre os quais estão presentes: EE2, levonorgestrel, progesterona, E2, E1, E3, metais pesados e BPA (EPHC/NRMMC/AHMC, 2008). Todavia tanto o padrão de potabilidade da água (*Australian Drinking Water Guidelines*) (NHMRC/NRMMC, 2022) quanto o padrão de reuso de água (EPHC/NRMMC/AHMC, 2008), não são obrigatórios e sim são apresentados na forma de valores-guia que precisam ser avaliados quanto a diversos fatores.

Nos EUA, a USEPA possui um programa de monitoramento para contaminantes não-regulamentados, cujo objetivo é promover determinações regulatórias para que sejam tomadas decisões quanto para regulamentação. Em 2016, a USEPA publicou a quarta lista de candidatos a contaminantes - CCL-4 (*Contaminant Candidate List*), listando 97 compostos ou grupos químicos, dentre os quais encontram-se os compostos EE2, E2, E1, E3, mestranol, equilenina, equilina e noretindrona e o NP (USEPA, 2016). Na última CCL publicada, em 2022, foram listados 69 compostos e grupos químicos permanecendo os DE estrogênicos citados (USEPA, 2022).

Cabe ressaltar que atualmente nenhum país possui regulamentação estabelecendo VMP em água destinada ao consumo humano para os DE. A WHO (2017), ainda relata que as concentrações das substâncias emergentes encontradas na água potável se encontram geralmente abaixo das doses terapêuticas mais baixas. Portanto, não considera que os microcontaminantes devam ser incluídos no monitoramento de rotina das estações de tratamento de água (ETAs), além de laborioso os métodos de análise. Contudo, indica a adoção de medidas para minimizar as emissões dos microcontaminantes, como o uso racional de medicamentos por meio da educação dos prescritores e de consumo público em geral.

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA

Devido à complexidade da composição das matrizes ambientais e as baixas concentrações dos DE, geralmente níveis traço ($\mu\text{g.L}^{-1}$ a ng.L^{-1}), a detecção e quantificação de tornam laboriosas (Pannekens *et al.*, 2019). Com isso, todos procedimentos analíticos de microcontaminantes ambientais necessitam de preparação das amostras, também conhecida como técnicas de extração ou *clean-up*.

A extração possui o objetivo de diminuir interferentes na matriz, isolar e concentrar os analitos de interesse a concentrações detectáveis pelos métodos utilizados (Câmara *et al.*, 2021). As técnicas mais utilizadas para extração dos microcontaminantes em matrizes ambientais são: a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) (Queiroz, 2011).

A ELL consiste na separação da amostra em duas fases imiscíveis, líquida e orgânica. O sucesso da extração é dependente da afinidade do soluto pelo solvente, da razão das fases e do número de extrações. O volume alto de amostra e solvente necessários para esse tipo de extração é uma desvantagem do processo, o que implica em problemas relacionados ao descarte; bem como a perda de analito devido à afinidade das amostras pela água (Queiroz, 2011).

A EFS é uma das técnicas de extração mais utilizadas, que consiste na percolação da amostra através do adsorvente, retendo os analitos de interesse, que posteriormente serão eluídos em solvente (Câmara *et al.*, 2021). É uma técnica simples, rápida e que requer pequenos volumes de solvente (Gomes, 2015; Queiroz, 2011).

Dentre as técnicas analíticas para quantificação de microcontaminantes, a cromatografia é a mais utilizada. Ela é definida como um método físico de separação em que os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma delas é fixa (fase estacionária) enquanto a outra (fase móvel) se move em uma direção definida (Câmara *et al.*, 2021). As principais técnicas cromatográficas são a cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance / Pressure Liquid Chromatography*, HPLC), ambas acopladas a espectrometria de massas ou outros detectores, que permite a detecção e quantificação de substâncias de diversas naturezas (Gomes, 2015).

Esteróides naturais e sintéticos e compostos fenólicos geralmente dominam a composição de DE presentes no esgoto (Konemann *et al.*, 2018). Esses compostos são

potentes e difíceis de serem detectados por métodos de triagem química, devido a limites de detecção insuficientes e necessitam de ensaios mais específicos (Finckh *et al.*, 2022). Durante o processo de extração na etapa de concentração dos extratos ou durante a eluição dos analitos dos cartuchos, também podem ocorrer perdas. Os métodos analíticos instrumentais são capazes de detectar e identificar os compostos presentes na amostra ambiental de forma individual, porém, quando se deseja mensurar os efeitos associados à exposição a uma substância/grupo de substâncias ou analisar compostos que atuem por um mesmo mecanismo de ação, é necessário recorrer aos bioensaios (Kunz *et al.*, 2017; Dvořáková *et al.*, 2016).

3.3 BIOENSAIOS *IN VIVO* E *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA

Os ensaios *in vivo* permitem avaliar os efeitos dos DE sobre a fisiologia de seres vivos por meio da medição de parâmetros característicos. Em peixes, por exemplo, são avaliadas anomalias nas gônadas ou os níveis de expressão proteica e atividade enzimática, como a produção de vitelogenina (VTG), declínio da reprodução e mortalidade (Bila, 2005). Também são muito utilizados ensaios em ratos, que avaliam as alterações fisiológicas como o aumento de peso de órgãos reprodutivos e glândulas endócrinas, mudanças hormonais, morfológicas e histopatológicas (Solano *et al.*, 2015).

Ho *et al.* (2022) evidenciam a dificuldade de extrapolar os resultados de testes realizados em cobaias em seres humanos, pois existem fatores comportamentais que influenciam nos efeitos dos DE. Existem benefícios nas pesquisas diretamente em seres humanos, pois elas permitem o estudo das rotas, misturas e evita a extrapolação interespecie. Além disso, evita a extrapolação de doses altas para baixas, uma vez que as concentrações de exposição realista em seres humanos são conhecidas. Contudo, as pesquisas em seres humanos possuem fatores difíceis de serem controlados, como por exemplo a exposição a outros fatores de riscos, como outras substâncias perigosas e os próprios DE (que não sejam alvo do estudo), o que pode superestimar os efeitos. Ademais, uma vez que estamos expostos a diversos DE, respostas individuais são complexas de serem modeladas. Há ainda a possível exposição precoce e alguns efeitos que podem se manifestar décadas depois da exposição, como no caso de efeitos cancerígenos (Ho *et al.*, 2022).

Já os ensaios *in vitro* para determinação da atividade estrogênica são baseados em mecanismos de ação que induzem a estimulação de receptores hormonais produzindo

respostas com o aumento da expressão de um gene repórter (Cunha, 2021). Nesse tipo de ensaio, é medida a atividade estrogênica total de uma amostra sem a identificação dos compostos causadores. A atividade estrogênica total é comparada com a atividade do hormônio natural E2, e pode ser expressa como equivalentes de E2 (EQ-E2) (Gomes, 2015; Lopes, 2016).

Os ensaios *in vitro* apresentam como vantagens em relação aos ensaios *in vivo* a não utilização de animais, rapidez, economia, simplicidade, reprodutibilidade e sensibilidade. Eles são úteis para determinar a atividade estrogênica em amostras ambientais contendo misturas complexas de contaminantes e para avaliar a atividade biológica de todos os seus componentes que atuam através do mesmo modo de ação (Bicchi *et al.*, 2009). Os bioensaios, têm se mostrado fundamentais para preencher as lacunas dos métodos analíticos. Os principais são o ensaio *E-screen* e o ensaio *in vitro* YES.

O ensaio *in vitro* YES utiliza a cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que possui uma sequência de DNA de receptor estrogênico humano (REh), com o objetivo de mensurar a atividade estrogênica total de uma mistura de substâncias (Routledge e Sumpter, 1996).

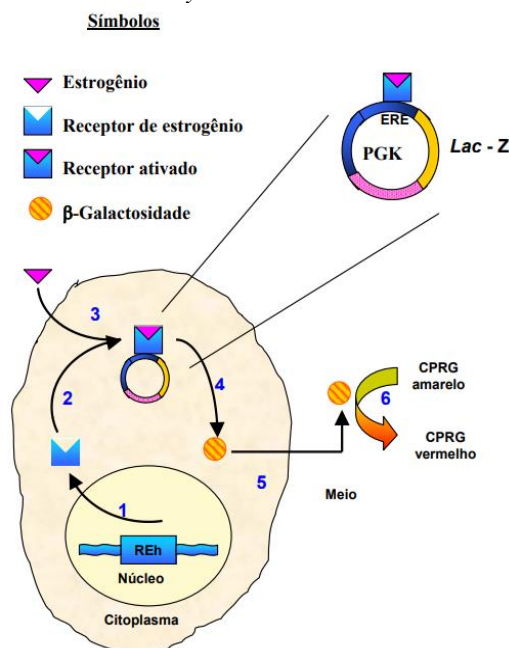
O uso dos ensaios *in vitro* e *in vivo* em conjunto permite uma avaliação mais ampla, possibilitando a caracterização da mistura de compostos, associando-os aos seus mecanismos de ação e aos seus potenciais efeitos. Porém, eles não fornecem dados sobre a identificação individual dos compostos, sendo necessária a utilização de métodos cromatográficos para tal (Escher, Stapleton e Schymansk, 2020).

3.3.1 Ensaio *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES)

O ensaio *in vitro* YES permite a determinação da atividade estrogênica utilizando uma estirpe da levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e foi desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996). A levedura não possui um REh e, portanto, é adicionada uma sequência de DNA com o REh no seu principal cromossomo. As células da levedura contêm plasmídeos de expressão do gene *Lac-Z*, que codifica a enzima β -galactosidase, que é usada para medir a estrogenicidade. Após a ligação a uma substância estrogênica, o receptor ocupado interage com os fatores de transcrição, expressando o gene *Lac-Z* e sintetizando a enzima β -galactosidase, secretando-a no meio onde ela metaboliza o substrato cromogênico *chlorophenol red- β -D-galactopyranoside* (CPRG), que normalmente é amarelo, até o produto *chlorophenol*

red (CPR), que possui coloração rosa/avermelhada (Argolo *et al.*, 2021; Gomes; 2020). Ou seja, a atividade estrogênica é detectada a partir da alteração da cor do meio de amarelo para vermelho. O esquema do processo transcricional do receptor estrogênico encontra-se na Figura 1.

Figura 1 – Esquema do sistema de expressão do receptor estrogênico induzido por substâncias estrogênicas em *Sacharomyces cerevisiae* BJ1991.



Fonte: Adaptado de Routledge e Sumpter (1996) *apud* Bila (2005).

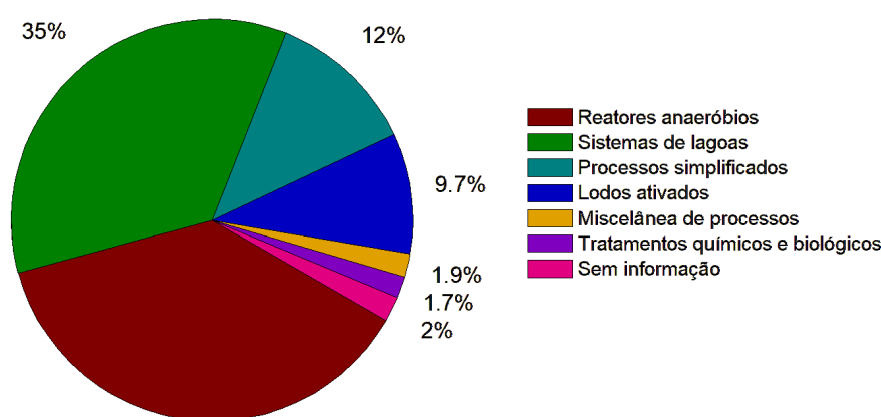
Legenda: O gene do REh é integrado ao genoma principal e é expresso (1) numa forma capaz de se ligar aos elementos de resposta ao estrogênio (ERE) dentro de um promotor híbrido no plasmídeo de expressão (2). A ativação do receptor (3), por ligação do ligante, provoca a expressão do gene repórter Lac-Z (4) que produz a enzima β -galactosidase. Esta enzima é secretada no meio (5) e metaboliza o substrato cromogênico CPRG (amarelo) em CPR (vermelho) (6), que pode ser medido por absorbância.

A determinação da atividade estrogênica é feita por espectrofotometria, por meio da medição da absorbância nos comprimentos de onda relativos a cor e a turbidez. Os resultados são comparados ao controle-positivo de E2, sendo os resultados expressos em concentração de EQ-E2. O E2 é uma unidade utilizada internacionalmente como padrão, devido sua potência *in vitro* e *in vivo* entre EE2 e E1, e assim é possível determinar os efeitos da amostra de forma precisa, pois, ela pode conter vários tipos de estrogênios (Kunz *et al.*, 2017). Além disso, EQ-E2 é utilizado em avaliações de risco, como o padrão médio da qualidade ambiental (*Annual Average Environmental Quality Standards — AA EQS*) da Diretiva-Quadro da Água da União Europeia (*Water Framework Directive — WFD*), que adotou a concentração limite de $0,4 \text{ ng.L}^{-1}$ para o E2 com base em testes ecotoxicológicos.

3.4 OCORRÊNCIA E REMOÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS

A Agência Nacional das Águas e Saneamento Básico (ANA) realizou um levantamento em 2020 onde contabilizou 3.774 ETEs no Brasil, sendo que 3.523 se encontram com o status de ativas. Os tipos de tratamento de efluentes sanitários com suas respectivas porcentagens das ETEs ativas apresenta-se na Figura 2.

Figura 2 – Principais tipos de tratamentos de efluentes domésticos utilizados no Brasil.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O sistema de tratamento por lodos ativados (LA) é o mais empregado no tratamento de águas residuárias no mundo todo (Von Sperling, 2016). Seu objetivo principal é a remoção de matéria orgânica biodegradável e de sólidos em suspensão, e pode ser adaptado para remoção biológica de nitrogênio e fósforo (Von Sperling, 2016). O sistema LA possui como vantagem a alta qualidade no efluente final e baixos requisitos de área. Entretanto, possuem um alto índice de mecanização quando comparado a outras tipologias de tratamento, necessitando de mão-de-obra sofisticada e maiores consumos de energia (Von Sperling, 2016).

No Brasil predominam os reatores anaeróbios (RA), os sistemas de lagoas e os processos simplificados (Figura 2). Von Sperling (2016) ressalta que a expansão dos RA no Brasil, principalmente dos reatores tipo UASB, está associada às vantagens de baixas produção de lodo, consumo de energia, requisitos de área e custo de construção, aliada à possibilidade de aplicação de baixa a grande escala e a produção de biogás. Para lagoas de estabilização geralmente são esperadas boas remoções de matéria orgânica e sólidos

suspensos (Von Sperling, 2017). Lagoas de estabilização apresentam baixos custos de implantação e operação, bem como facilidade operacional, quando comparado as demais tipologias aplicadas em grande escala.

Em uma revisão de estudos de 2009 a 2011, Luo *et al.* (2014) encontraram taxas de remoção de estrogênios acima de 70% para LA. Os autores observaram que as eficiências variam conforme o composto estrogênico: 17 β -estradiol (98%), estriol (100%), estrona (82%) e 17 α etinilestradiol (71%). Estudos mais recentes encontraram eficiências de remoção acima de 90% para atividade estrogênica (Argolo, 2022; Coleman *et al.*, 2008; Lopes, 2016) em ngEQ-E2. A ocorrência de atividade estrogênica pode ser observada na Tabela 7.

Tabela 7 – Ocorrência e remoção da atividade estrogênica em estações de tratamento de efluentes domésticos por diferentes tipos de ensaios *in vitro*.

Concentração no esgoto bruto (ngEQ-E2.L ⁻¹)	Concentração no esgoto tratado (ngEQ-E2.L ⁻¹)	Remoção (%)	Tipo de tratamento	Local	Bioensaio	Referência
15 - 41,4	<LD - 28	92	LA	Brasil/ RJ	YES	(Argolo, 2022)
1,08 - 4,61	0,02 - 0,2	-	LA	Brasil/ RJ	YES	(Barcellos, 2016)
<LD - 123,0	<LD e 11	-	LAAP	Brasil/ RJ	YES	(Gomes, 2020)
14,7 - 52,6	0,91 - 2,93	80	LA	Brasil/ SP	BLYES	(Lopes, 2016)
22,1 - 31,9	2,44 - 11	90	LA	Brasil/ SP	BLYES	(Lopes, 2016)
27 - 72	0,2 - 6,9	-	LA	Canadá	ER α CALUX	(Petosa, 2022)
-	<LD - 1,0	-	LA	Alemanha	ER α CALUX	(Shuliakovich <i>et al.</i> , 2022)
-	0,2 - 6,9	-	LA	África do Sul	YES	(Archer, 2020)
13,9	-	-	-	Alemanha	A-YES	(Hettwer, 2018)
37 - 100	0,7 - 8,3	88	LA	Suíça	YES	(Margot <i>et al.</i> , 2013)
-	34,1 - 65,96	-	LA	Alemanha	YES	(Pawlowski <i>et al.</i> , 2004)
-	0,0004 - 21,61	-	LA	EUA	BLYES	(Wang <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: *Arxula-Yeast Estrogen Screen* (A-YES), *Bioluminescence Yeast Estrogen Screen* (BLYES), *Chemical-Activated Luciferase Expression* (ER α CALUX), Estado Unidos da América (EUA) limite de detecção (LD), lodos ativados (LA), lodos ativados com aeração prolongada (LAAP), bioreatores a membrana (MBR), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), YES (*Yeast Estrogen Screen*).

Observa-se na Tabela 7 que a atividade estrogênica varia bastante no efluente bruto no Brasil, no entanto, altas eficiências de remoção e baixas concentrações estrogênicas no efluente tratado foram encontradas pelos autores.

Os principais mecanismos atuantes na degradação de microcontaminantes em geral em ETEs são a sorção e a biodegradação, e estes são influenciados pelas propriedades físico-químicas dos microcontaminantes, pela configuração dos sistemas de tratamento, pelas condições ambientais e pelos parâmetros operacionais das unidades da ETE, como o tempo de detenção hidráulica (TDH) e idade do lodo (Θ) (Tan *et al.*, 2021).

A sorção é o fenômeno de transferência de massa no qual moléculas passam de uma fase fluida (líquida ou gasosa) e tornam-se associados a uma fase sólida (Aquino, Brandt e Chernicharo, 2013). O valor do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), também conhecido como fator de hidrofobicidade/lipofilicidade, é um indicador importante do comportamento de moléculas orgânicas no ambiente. Valores de $\log K_{ow}$ inferiores a 2,5 indicam baixo potencial de sorção em matéria orgânica, entre 2,5 e 4,0 indicam potencial moderado, e maiores que 4,0 indicam alto potencial de sorção (Aquino, Brandt e Chernicharo, 2013). O grau de hidrofobicidade/lipofilicidade também está relacionado à polaridade da substância e aumenta conforme o peso molar da substância. A capacidade de sorção também pode ser mensurada pelo coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}), que também aumenta conforme a hidrofobicidade e o $\log K_{ow}$ (Ma e Yates, 2018). Os valores do $\log K_{ow}$ e $\log K_{oc}$ para os principais compostos estrogênicos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Principais compostos estrogênicos e suas propriedades físico-químicas.

Hormônio	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Log K_{ow}	Log K_{oc}	Solubilidade (mg.L ⁻¹)
Estrona (E1)	270,4	3,43	3,69	13
17 β -estradiol (E2)	272,4	3,94	3,52	13
Estriol (E3)	288,4	2,81	3,29	13
17 α -etinilestradiol (EE2)	296,4	4,15	3,67	4,8
Bisfenol A (BPA)	228	3,32	2,50	120
Nonilfenol (NP)	220,2	3,70	4,48	12,6

Fonte: Adaptado de Vega-Morales *et al.* (2013).

A hidrofobicidade moderada e o peso molecular relativamente alto dos estrogênios favorecem a sua adsorção em partículas sólidas com características hidrofóbica, sendo esse mecanismo uma via importante de remoção dos hormônios da fase aquosa, observado em águas naturais e nas ETEs (Ahmed *et al.*, 2017; Varticovski *et al.*, 2022).

A degradação das moléculas adsorvidas no lodo ocorre conforme a biodisponibilidade e concentrações dos compostos e da biomassa suficiente para degradá-los. A biodisponibilidade é dependente da solubilidade (Aquino, Brandt e Chernicharo, 2013) e esta

é influenciada pela temperatura, K_{ow} , potencial redox, das propriedades dos compostos, dentre outros. Hormônios naturais geralmente possuem maior solubilidade (13 mg.L^{-1}), como E1, E2 e E3, do que os sintéticos, como o EE2 ($4,8 \text{ mg.L}^{-1}$), como pode ser visto na Tabela 8.

Gomes (2020) reportou resultados analisando a fração particulada e dissolvida de diferentes matrizes ambientais (água superficial, lixiviado de aterro sanitário e efluente doméstico bruto e tratado), indicando a sorção em sólidos suspensos como um importante via de remoção da estrogenicidade. Este processo também foi observado por Argolo (2022), que avaliou a estrogenicidade em efluente doméstico e constatou que no efluente bruto ela esteve quase que exclusivamente associada à fase dissolvida apesar da elevada concentração de SST, e no efluente tratado a estrogenicidade esteve majoritariamente associada a fase particulada, contribuindo com 65 a 100 % do EQ-E2 total, o que indica a transferência da fase líquida para sólida durante o processo de tratamento do esgoto.

Apesar de grande parte dos estrogênios serem eliminados por humanos nas fezes e urina na forma conjugada (que é menos ativa biologicamente), como glicuronídeos ou sulfonídeos, em ETEs e em águas naturais os DEs são geralmente encontrados em suas formas livres (Azizi *et al.*, 2022; Bila, 2005). A desconjugação dos estrogênios é atribuída à atuação das bactérias presentes no lodo biológico, principalmente pela *Escherichia coli* (Esteban *et al.*, 2014; Fent, Weston e Caminada, 2006; Ternes *et al.*, 1999). A *Escherichia coli* é a bactéria mais comum no esgoto doméstico bruto pois é abundantemente presente nas fezes e pode facilmente desconjugar esteróides, uma vez que podem sintetizar grandes quantidades da enzima *glucuronidase* (Ternes, 1999). A atividade microbiana é mais eficiente na degradação de compostos mais simples, enquanto as estruturas químicas mais complexas, como os compostos saturados e aromáticos, são menos biodegradáveis (Birkett e Lester, 2003).

O sistema de tratamento por LA possui uma biomassa mais adaptada para remoção de compostos simples e em maior concentração. Segundo Johnson *et al.* (2005), altas eficiências de remoção de microcontaminantes estão associadas a idades do lodo mais altas, uma vez que esta torna a concentração da biomassa mais intensa e mais diversa no tanque de aeração (Castro, 2017). Além disso, o TDH mais alto possibilita um maior período de contato dos compostos com a biomassa para a degradação por ação microbiana. Em lodos ativados convencionais (LAC), geralmente o TDH varia de 6 a 8 horas e a Θ de 4 a 10 dias (Von Sperling, 2016). Variantes do sistema LA, como LAAP, possuem parâmetros operacionais mais elevados, com TDH entre 16 e 24 horas e Θ entre 18 e 30 dias (Von Sperling, 2016).

Para avaliar os mecanismos de remoção de estrogênios no tratamento de esgoto por LA, Bernardelli (2014) avaliou seus decaimentos utilizando lodo proveniente de uma ETE municipal em um reator de bancada (aeróbio e de bateladas sequenciais – SBR). O autor avaliou o lodo ativo (com população microbiana ativa) e inativo (autoclavado), avaliando a influência do TDH e da idade do lodo na remoção dos hormônios E1, E2 e EE2.

Em sistema com lodo inativo (previamente autoclavado), a concentração de EE2 foi reduzida em 94% em 1 hora, de forma mais eficiente e rápida do que E1 e E2, que foram removidos em 76,7% e em 81,5%, respectivamente, ambos em 24 horas. Esse fato foi associado ao valor de $\log K_{ow}$ para EE2 (4,1) mais elevado do que para os hormônios naturais E1 e E2 (3,1 e 3,4, respectivamente). Já em um lodo ativo (biomassa ativa), as remoções foram de 100%, 98%, 84%, para E1, E2 e EE2, respectivamente. Contudo, para o E1 o TDH foi de 24 horas e para o EE2, foi superior, de 34 dias, ambos tratados em um reator aeróbio. Para o E2 o TDH foi de 24 horas e o tratamento utilizado foi reatores SBR. Assim, a coexistência da adsorção e da biodegradação foi observada principalmente na degradação dos hormônios naturais. Já para o EE2, a sorção prevaleceu em relação a biodegradação, já que para o lodo ativo, para uma boa remoção, foi necessário um TDH superior, de 34 dias.

Além disso, observou-se que quando os estrogênios são a principal fonte de carbono, o desenvolvimento de microrganismos específicos capazes de degradar esses compostos aumenta. Além disso, a alta e rápida remoção do EE2 em lodo inativo pode estar associada à inativação do lodo em autoclave, que pode afetar em mudanças nas partículas da biomassa, como porosidade, densidade, área superficial disponível, e o conteúdo de proteínas e carboidratos presente nos flocos e isso afetar o K_d (coeficiente de sorção) do lodo (Bernardelli, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA

Amostras de efluente sanitário foram coletadas em uma ETE localizada na zona da mata mineira. A ETE é de médio porte com capacidade de tratamento de 60 L.s^{-1} e atende a população de 40.000 hab (CESAMA, 2018), cerca de 7,40% da população total da cidade, de 540.756 habitantes (IBGE, 2023). A estação recebe esgoto doméstico e efluentes não-domésticos, como lixiviados de aterros, lodos de fossa séptica, efluentes de banheiros químicos, dentre outros.

O tipo de tratamento utilizado na estação é o sistema LAAP, cujas unidades de tratamento são o tratamento preliminar, tanque de equalização, tanque de aeração (Figura 5) e decantador secundário (Figura 6).

O tratamento preliminar é composto pelo gradeamento (Figura 3), para retenção dos sólidos grosseiros, seguido pelo desarenador (Figura 4) para remoção de sólidos grosseiros e areia, seguido da calha *Parshall* para medição da vazão.

Figura 3 – Gradeamento.



Fonte: Diniz (2021).

Figura 4 – Desarenador.



Fonte: Diniz (2021).

O tanque de equalização de vazão possui o objetivo de homogeneizar a massa líquida e controlar a vazão de entrada para que o fluxo de esgoto seja constante ao adentrar o tanque de aeração. Esse tanque possui um aerador com a função de evitar a sedimentação dos sólidos e iniciar o processo de degradação da matéria orgânica na unidade, evitando assim, a geração de maus odores. O tanque de aeração (Figura 5) objetiva a degradação da matéria orgânica biodegradável pela ação dos microrganismos.

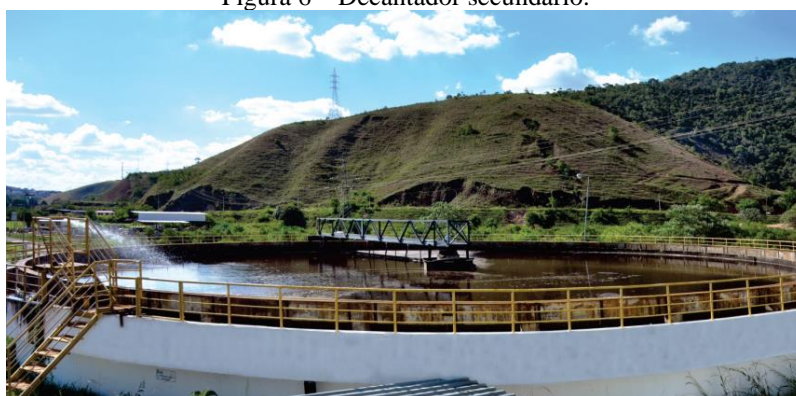
Figura 5 – Tanque de aeração.



Fonte: Acervo pessoal (2023).

Em seguida, há o decantador secundário (Figura 6), onde os sólidos são sedimentados por gravidade e recirculam para o tanque de aeração. O efluente tratado é lançado no rio Paraibuna e o lodo excedente do decantador é bombeado para digestão aeróbia, seguindo para desidratação em centrífuga. O líquido excedente é enviado de volta ao tanque de equalização e passa novamente pelo processo de tratamento, já o lodo centrifugado é destinado ao aterro sanitário.

Figura 6 – Decantador secundário.



Fonte: CESAMA/JF (2021).

As coletas foram realizadas mensalmente no período de maio de 2019 a março de 2020, e então foram interrompidas em decorrência da situação de pandemia da COVID-19. Posteriormente, foram retomadas de forma quinzenal dezembro de 2021 a junho de 2022, com

uma pausa nos meses de janeiro e fevereiro devido as manutenções realizadas na ETE. Ao todo foram realizadas 19 coletas.

A coleta foi realizada manualmente de forma composta, entre as 10 e 11 horas da manhã. Para tanto, foram coletadas quatro parcelas de aproximadamente 250 mL, a cada 20 minutos, constituindo o volume total de 1 L. O esgoto bruto foi coletado na entrada da estação, antes do gradeamento (Figura 2) e o tratado após a unidade de decantação (Figura 6). As datas e respectivos dados associados a cada coleta encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Dados das coletas.

Número da coleta	Data	Vazão (L.s ⁻¹)		Chuva acumulada (mm)	
		Entrada	Saída	7 d antes da coleta	24 h antes da coleta
1	26/05/2019	57,0	41,9	9,6	0
2	03/07/2019	58,1	46,1	0,2	0
3	30/07/2019	56,4	60,5	0,0	0
4	14/08/2019	54,3	43,2	0,0	0
5	18/09/2019	53,6	36,1	0,0	0
6	14/10/2019	46,8	45,9	47,6	0
7	11/11/2019	54,7	48,4	37,8	8,0
8	06/02/2020	56,3	47,9	71,0	15,2
9	09/03/2020	53,5	50,5	111,8	10,8
10	07/12/2021	38,8	39,0	110,4	20,2
11	20/12/2021	52,3	52,3	174,6	0
12	08/03/2022	54,3	56,7	2,2	0
13	22/03/2022	51,3	51,9	2,0	0,8
14	05/04/2022	50,7	47,1	38,4	0
15	25/04/2022	49,2	49,5	0	0
16	02/05/2022	44,7	47,2	4,8	0
17	16/05/2022	81,5	47,4	0	1,0
18	06/06/2022	29,7	9,2	0	0
19	21/06/2022	28,6	40,8	0,8	0,2

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Qualidade Ambiental (LAQUA/UFJF). As amostras de esgoto bruto e tratado foram caracterizadas por meio dos seguintes parâmetros físico-químicos: demanda química de oxigênio (DQO) total e filtrada, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), nitrogênio orgânico (Norg), nitrogênio total *kjeldahl* (NTK), nitrato (NO₃⁻), pH, condutividade elétrica e sólidos suspensos totais (SST). Com exceção do pH e da condutividade, que foram medidas em triplicata, os demais parâmetros foram

analisados em duplicata. As metodologias utilizadas para cada parâmetro estão descritas em APHA, AWWA, WEF (APHA, 2015) e encontram-se resumidas na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias.

Parâmetros	Método
DQO total e filtrada	5220 D
N-NH ₃	4500-NH ₃ B e 4500-NH ₃ C
NO ₃ ⁻	Rodier (2009) – método espectrofotométrico – salicilato de sódio
NTK e Norg	4500-NH ₃ B, 4500-NH ₃ C, 4500-N _{org} B e 4500-N _{org} C
pH	4500-H ⁺ B
Condutividade	2510 B
SST	2540 D

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: demanda química de oxigênio (DQO) total e filtrada, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), nitrogênio total *kjeldahl* (NTK), nitrogênio orgânico (Norg), nitrato (NO₃⁻), sólidos suspensos totais (SST).

4.3 ENSAIO YEAST ESTROGEN SCREEN (YES)

No presente trabalho foi realizada a avaliação da atividade estrogênica da fase dissolvida de amostras aquosas de efluente doméstico bruto e tratado de uma ETE com LAAP. Também foram determinados os limites de detecção e de quantificação do ensaio e o teste de recuperação. Os ensaios YES foram realizados no Laboratório de Qualidade Ambiental (LAQUA/UFJF) e no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES/UERJ).

O protocolo do ensaio *in vitro* YES seguiu a metodologia proposta por Routledge e Sumpter (1996), com algumas alterações propostas por Gomes (2020), que em seu trabalho estudou os fatores interferentes no ensaio YES para alcançar boas condições de realização do ensaio e otimizar o protocolo de análise para matrizes ambientais. Tais modificações foram: (i) a densidade celular inicial; (ii) o tempo de incubação celular antes do ensaio; e (iii) a diluição serial. A densidade celular inicial foi medida por meio da leitura da absorbância em 620 nm, como método alternativo à contagem direta manual, feita por microscopia com câmara de Neubauer. O tempo de incubação para crescimento celular que precede o ensaio utilizado foi de 24 horas, advindo do pré-inóculo, cujo crescimento foi de 48 horas. Nessa fase, as células crescem exponencialmente, o que garante sua capacidade de reprodução e crescimento durante a incubação do ensaio. A diluição foi realizada na proporção de 1:2 e de forma seriada, em etanol absoluto. Os procedimentos de montagem do ensaio YES foram

realizados na cabine de segurança biológica e com materiais estéreis descartáveis (placas e ponteiros) ou esterilizados (frascos de vidro).

4.3.1 Materiais e reagentes

Os reagentes que compõem o meio de cultivo e de análise usados no ensaio YES, foram adquiridos das seguintes marcas: Dinâmica, Êxodo Científica, Merck, Neon Lab, Sigma Aldrich e Synth, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Reagentes utilizados no ensaio YES.

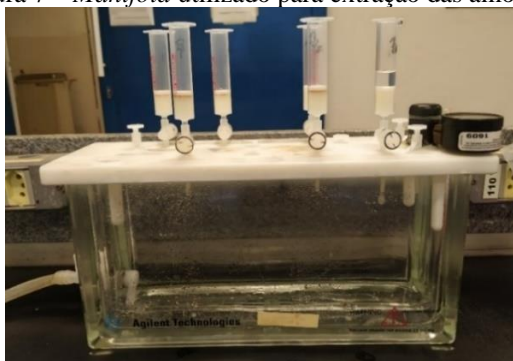
Êxodo Científica	Merck	Synth
Ácido L-aspartico	<i>Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside</i> (CPRG)	Adenina
Biotina	L-isoleucina	Inositol
Etanol PA	Sigma-Aldrich	L-ácido glutâmico
Hidróxido de potássio (KOH)	17β-estradiol	L-fenilalanina
L-arginina-HCl	Neon Lab	L-histidina
L-leucina	Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	L-lisina-HCl
L-serina	Glicose	L-metionina
L-valina	Dinâmica	L-tirosina
Piridoxina	Pantetonato de cálcio	L-treonina
Sulfato de cobre II (CuSO ₄)		Sulfato de ferro III (Fe ₂ (SO ₄) ₃)
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)		Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)
		Tiamina

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para SPE, foram utilizados os solventes metanol (PA), acetona (PA) e acetato de etila (PA), da Êxodo Científica e a água deionizada foi obtida por meio do sistema de purificador de água de osmose reversa OS10 LX (GEHAKA).

A filtração das amostras foi realizada com membranas de fibra de vidro de 1,2 µm Millipore®. Os cartuchos utilizados para a extração em fase sólida foram: Strata-X (sorvente polimérico à base de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada), 500mg/ 6mL, Phenomenex®. Para extração foi utilizado o *manifold* (Figura 7).

Figura 7 – *Manifold* utilizado para extração das amostras.



Fonte: Acervo pessoal (2023).

O cultivo de leveduras e o ensaio YES foram realizados em frascos de cultura de células de 50 mL (K11- 2050) e microplacas de 96 poços (K12-096), respectivamente, da Kasvi. As leituras das absorbâncias do ensaio YES foram realizadas pela leitora Multiskan® FC, da Thermo Scientific. Todos os reagentes e materiais utilizados no preparo das amostras e no ensaio *in vitro* YES encontram-se no ANEXO A.

4.3.2 Preparo das amostras e extração em fase sólida (SPE)

O preparo e extração das amostras foi realizado conforme Queiroz (2011) . O processo de extração foi escolhido em virtude do projeto no qual a dissertação estava inserida juntamente com ETEs de outras cidades, cujas amostras de efluente sanitário foram analisadas pelo mesmo processo de extração.

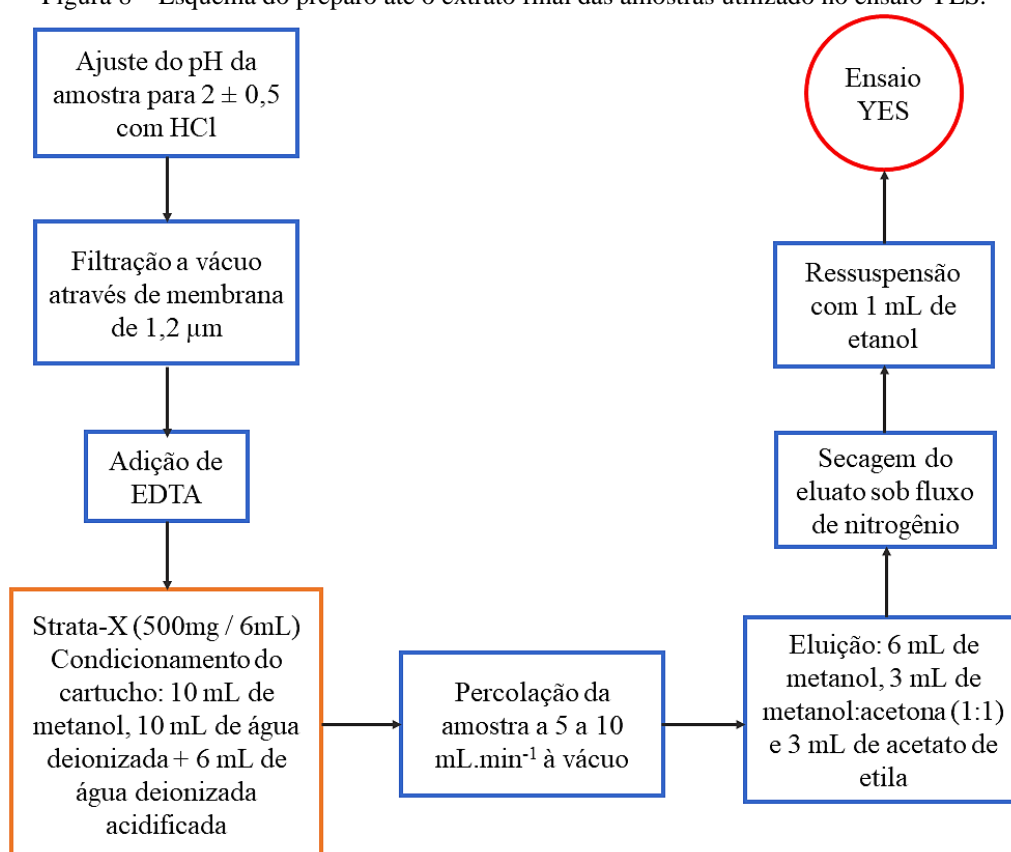
Inicialmente, foi realizada a acidificação de 200 mL de amostra com solução aquosa de HCl (37% v/v) até pH $2,0 \pm 0,5$. Posteriormente, foram filtrados 100 mL da amostra (em duplicata) em sistema de filtração à vácuo, utilizando a membrana de fibra de vidro de 1,2 μm . Ao final, fo adicionado 50 mg de EDTA a amostra filtrada, aguardando no mínimo 1 hora.

O processo de extração iniciou-se com o condicionamento do cartucho SPE (Strata-X 500mg / 6mL), adicionando os solventes na seguinte ordem: 10 mL de metanol, 10 mL de água deionizada e 6 mL de água deionizada acidificada com HCl (pH $2,0 \pm 0,5$). A seguir, passaram pelo cartucho 100 mL da amostra, preparada conforme item 4.5, com fluxo de gotejamento com vazão de 5 a 10 mL.min⁻¹. Por último, os analitos foram eluídos dos cartuchos, por meio da adição dos solventes e misturas: 6 mL de metanol, 3 mL de metanol:acetona (1:1) e 3 mL de acetato de etila, utilizando o *Manifold*.

Posteriormente, o eluato foi levado para secagem completa, em capela de exaustão, sob o fluxo de nitrogênio gasoso e banho-maria à temperatura máxima de 50°C. Antes do ensaio YES a amostra foi ressuspensa, por meio da adição de 1 mL de etanol absoluto.

O resumo das etapas da EFS encontra-se na Figura 8. A cada batelada de ensaios foi realizado o mesmo processo para a água deionizada (branco) para controle de qualidade do ensaio.

Figura 8 – Esquema do preparo até o extrato final das amostras utilizado no ensaio YES.



Fonte: Adaptado de Gomes (2015).

4.3.3 Cultivo e conservação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

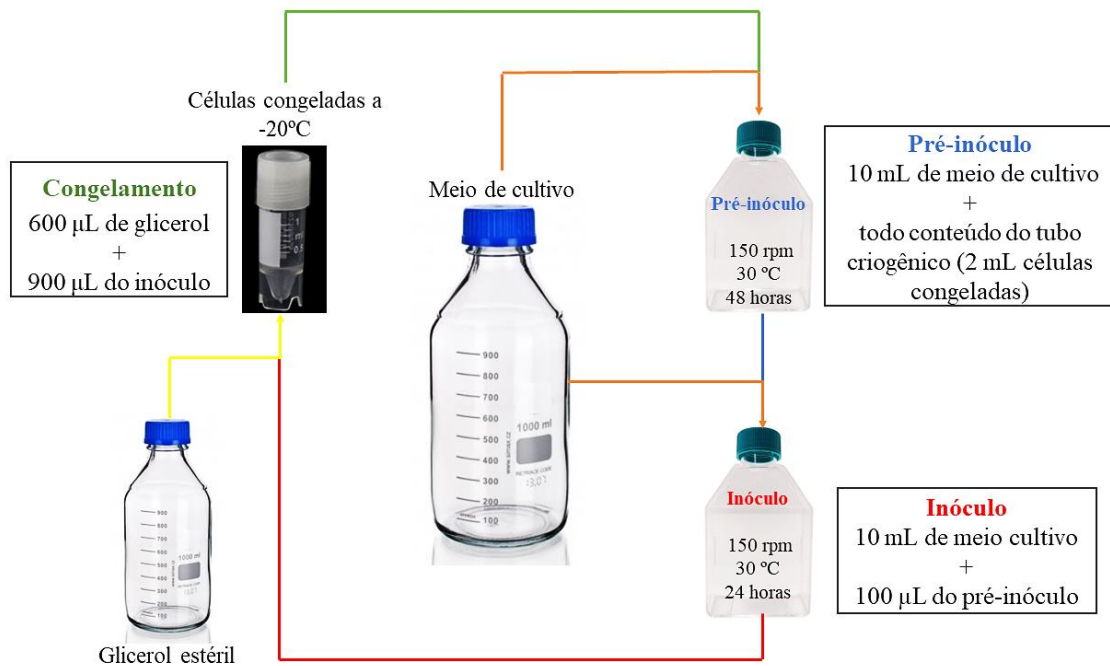
O ensaio YES utiliza a estirpe da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A estirpe utilizada no processo de transformação foi a BJ1991 (Bistan *et al.*, 2012) e foi construída por técnicas de engenharia genética e conforme disponibilizado pela Glaxo Group Research (Routledge e Sumpter, 1996).

A solução estoque contendo a estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante utilizada foi gentilmente cedida pela professora Daniele Maia Bila (LES/UFRJ) e seu preparo

seguiu a metodologia proposta por Gomes (2020). As células da levedura foram congeladas à -4°C , em tubos criogênicos de 2 mL, nos quais foram adicionados 600 μL de glicerol e 900 μL da solução contendo a levedura.

72h antes do ensaio foi realizado o pré-inóculo. Este possui a função de reativar as células que estavam refrigeradas em coleção, em baixo metabolismo ou em bancada ou geladeira. O procedimento de inoculação consistiu na utilização de todo conteúdo do tubo criogênico mantido em refrigeração ou na adição de 100 μL da solução estoque de levedura, mantida em bancada, em 10 mL de meio de cultivo e mantidas a 30°C em estufa ou a 150 rpm em um agitador orbital. Toda manipulação da estirpe foi realizada em cabine de segurança biológica classe II A1 (FilterFlux®). O resumo dos procedimentos descritos encontra-se na Figura 9.

Figura 9 – Esquema do cultivo e conservação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de Gomes (2015).

O inóculo foi feito 24 horas antes do ensaio YES e cujo procedimento de incubação é o mesmo do pré-inóculo.

4.3.4 Procedimentos do ensaio YES

Ao todo foram realizados dez ensaios, ondem foram avaliadas 51 amostras, das quais 24 foram de efluente bruto, 21 de efluente tratado e 6 de branco.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo chato e estéreis, onde cada linha foi ocupada por uma amostra ambiental em 12 concentrações de diluição serial ou pelo controle positivo (12 concentrações de diluição seriada do E2, variando de 2724 a 1,33 ng L⁻¹ no poço) e pelo controle negativo (somente etanol). A diluição serial é realizada para garantir que as concentrações da amostra estejam dentro da curva de controle positivo e para reduzir a toxicidade da amostra.

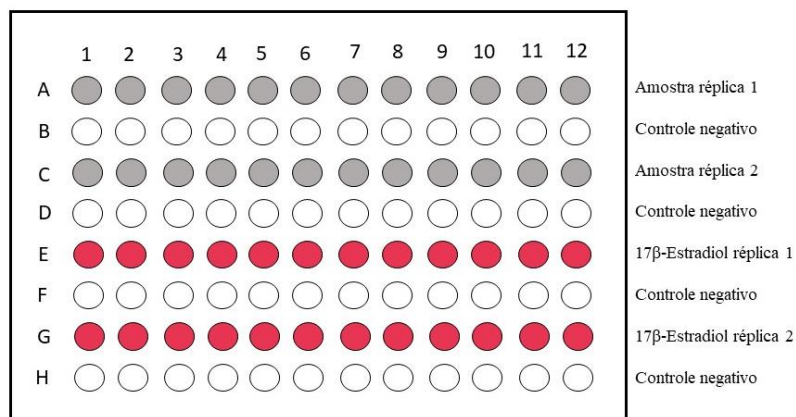
Inicialmente, na placa de análise, foram adicionados 10 µL de etanol nas fileiras do controle negativo (fileiras B, D, F, H; Figura 10). Este procedimento foi realizado primeiro, antes de qualquer manipulação com soluções contendo levedura, amostras ou hormônios, para reduzir a possibilidade de contaminação da placa.

Os extratos das amostras foram diluídos na proporção 1:2. Inicialmente, foram adicionados 100 µL de etanol nos poços da fileira de diluição do extrato, com exceção do primeiro poço. Posteriormente, adicionou-se 200 µL dos extratos de amostra, nos primeiros poços respectivos as fileiras de amostra. Após, foram retirados 100 µL da amostra no 1º poço e passados para o 2º poço (agitando com a própria pipeta para homogeneizar), esse procedimento foi realizado sucessivamente até o último poço da fileira, que ficou com o volume de 200 µL.

Como referência de controle positivo foi construída a curva padrão de 17β-estradiol, a cada batelada de ensaios, de forma semelhante às amostras ambientais. Uma solução estoque foi previamente preparada com a concentração de 54,48 µg.L⁻¹ de 17β-estradiol em etanol, para tal.

Imediatamente após a diluição, foram transferidos para cada poço da placa de análise 10 µL dos extratos das amostras diluídas. A disposição da amostra e dos controles negativo e positivo (17β-estradiol) encontram-se na Figura 10.

Figura 10 – Disposição do controle positivo (17 β -estradiol), da amostra e do controle negativo na placa de análise.

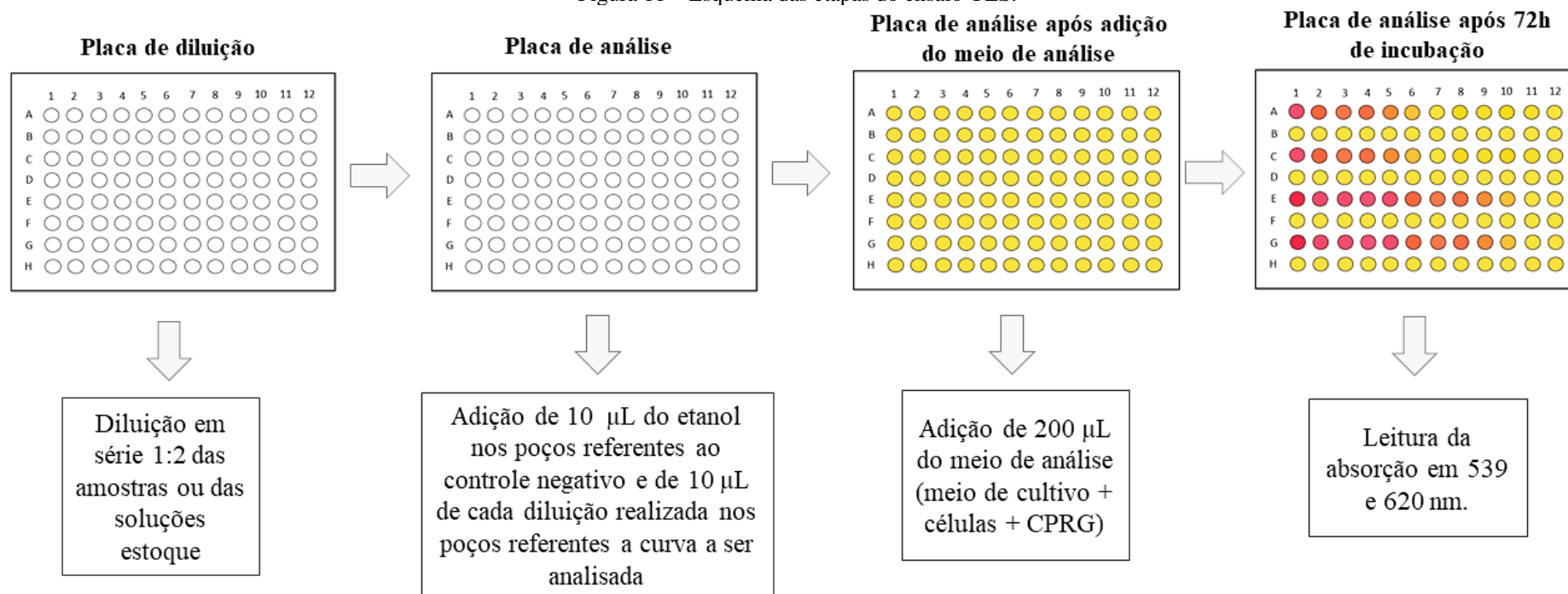


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após a evaporação das amostras e dos controles na placa de análise, foram adicionados 200 μ L do meio de análise em cada poço das placas, começando pelo controle negativo para evitar a contaminação desses poços. O preparo do meio de análise encontra-se no ANEXO A. As placas foram seladas dentro da capela de fluxo laminar, agitadas manualmente por 2 minutos e incubadas a 30°C por 72 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro (DR6000, Hach) com entrada para microplacas de 96 poços, nos comprimentos de onda de 539 nm para cor e 620 nm para turbidez.

O resumo das etapas de preparação das placas de diluição e de análise encontra-se na Figura 11.

Figura 11 – Esquema das etapas do ensaio YES.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.3.4 Teste de recuperação e limites de detecção e quantificação

O teste de recuperação e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizados conforme a normatização do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) para validação de métodos analíticos, de 2020.

Para estimar a porcentagem de recuperação dos microcontaminantes com atividade estrogênica foi realizado teste de recuperação para solução de E2, abrangendo as etapas de preparo da amostra e o ensaio YES. Para tal, foram preparadas três concentrações de E2 em metanol, e a seguir diluídas em água deionizada nas concentrações de 500, 100 e 50 ng.L⁻¹. Em seguida, a água contendo o hormônio foi submetida pela mesma etapa de preparo, filtração e extração das amostras de efluente doméstico. Após a eluição, os extratos foram analisados conforme descrito no item 4.5. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em duplicatas. A recuperação do método foi estimada por meio da Equação 1.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

C₁: concentração do analito na amostra fortificada;

C₂: concentração do analito na amostra não fortificada;

C₃: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

O LD corresponde a menor concentração detectável no ensaio, que foi calculada com base na curva dose-resposta do controle positivo 17β-estradiol, pela Equação 2.

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{p} \quad (2)$$

Onde,

s: desvio padrão da resposta do branco;

p: inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

O LQ corresponde a menor concentração quantificável do ensaio e foi obtido por meio da Equação 3.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{p} \quad (3)$$

4.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.4.1 Atividade estrogênica

Inicialmente, foi feita a correção da resposta estrogênica de cada amostra analisada para turbidez, aplicada para cada poço da microplaca, conforme a Equação 4:

$$Abs_{\text{corrigida, amostra}} = Abs_{S539, amostra} - (Abs_{S620, amostra} - Abs_{S620, controle\ negativo}) \quad (4)$$

A absorbância do controle negativo foi calculada a partir da média das duas fileiras de controle negativos, que são correspondentes às fileiras B e D ou F e H, no qual têm-se 24 amostras de controle negativo para cada duplicata.

Com o software Origin® 6.0 (OriginLab), foram traçadas as curvas dose-resposta, usando absorbâncias médias corrigidas versus concentrações (ng.L^{-1}), em escala logarítmica. As curvas padrão do controle positivo E2 foram ajustadas a uma função logística simétrica. As curvas para as amostras foram construídas de forma semelhante.

Para as amostras ambientais foi calculado o equivalente estradiol (EQ-E2) da máxima indução da *β -galactosidase*. Ele foi determinado por meio da interpolação dos dados da curva da amostra com os da curva do controle positivo E2 e pelo ajuste dos dados experimentais pela Equação 5, pelo método dos mínimos quadrados.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (5)$$

Onde,

A_1 : absorbância corrigida máxima da curva de E2 ajustada;

A_2 : absorbância corrigida mínima da curva de E2 ajustada;

x_0 : CE50 para E2 em ng.L^{-1} ;

p : inclinação da curva sigmoidal;

x , y : par ordenado relacionado a uma concentração de amostra e sua resposta na absorbância corrigida.

O CE50 representa a concentração que descreve uma atividade igual a 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão. O valor do CE50 foi determinado a partir do ponto do meio da porção linear da curva de dose resposta sigmoidal.

O valor de EQ-E2 (ng.L^{-1}) foi calculado a partir do ponto que apresentou sinal de ruído, ou seja, com absorbância média acima do controle negativo. Assim, a concentração foi a média do trecho com os três pontos que apresentassem o melhor ajuste da reta por meio do valor do coeficiente de ajuste linear R^2 .

Posteriormente, para determinar o valor real de EQ-E2 foi utilizada a Equação 6.

$$EQ - E_2 = \frac{y \times FD}{FC} \quad (6)$$

Onde,

FC: pelo fator de concentração;

FD: fator de diluição.

A ocorrência de citotoxicidade (inviabilização ou inibição do crescimento das células de levedura devido algum composto presente na amostra) é indicada pela ausência de turbidez no fundo do poço da placa de teste. Frische *et al.* (2009), propõem a utilização do controle da absorbância a 620 nm como ferramenta para quantificar a inibição do crescimento por meio da Equação 7.

$$\text{Citotoxicidade} = 1 - \left(\frac{\text{Abs}_{620, \text{amostra}}}{\text{Abs}_{620, \text{controle negativo}}} \right) \quad (7)$$

Onde,

- Toxicidade = 0: o crescimento de células na amostra e no controle negativo foram iguais, portanto, não há toxicidade;

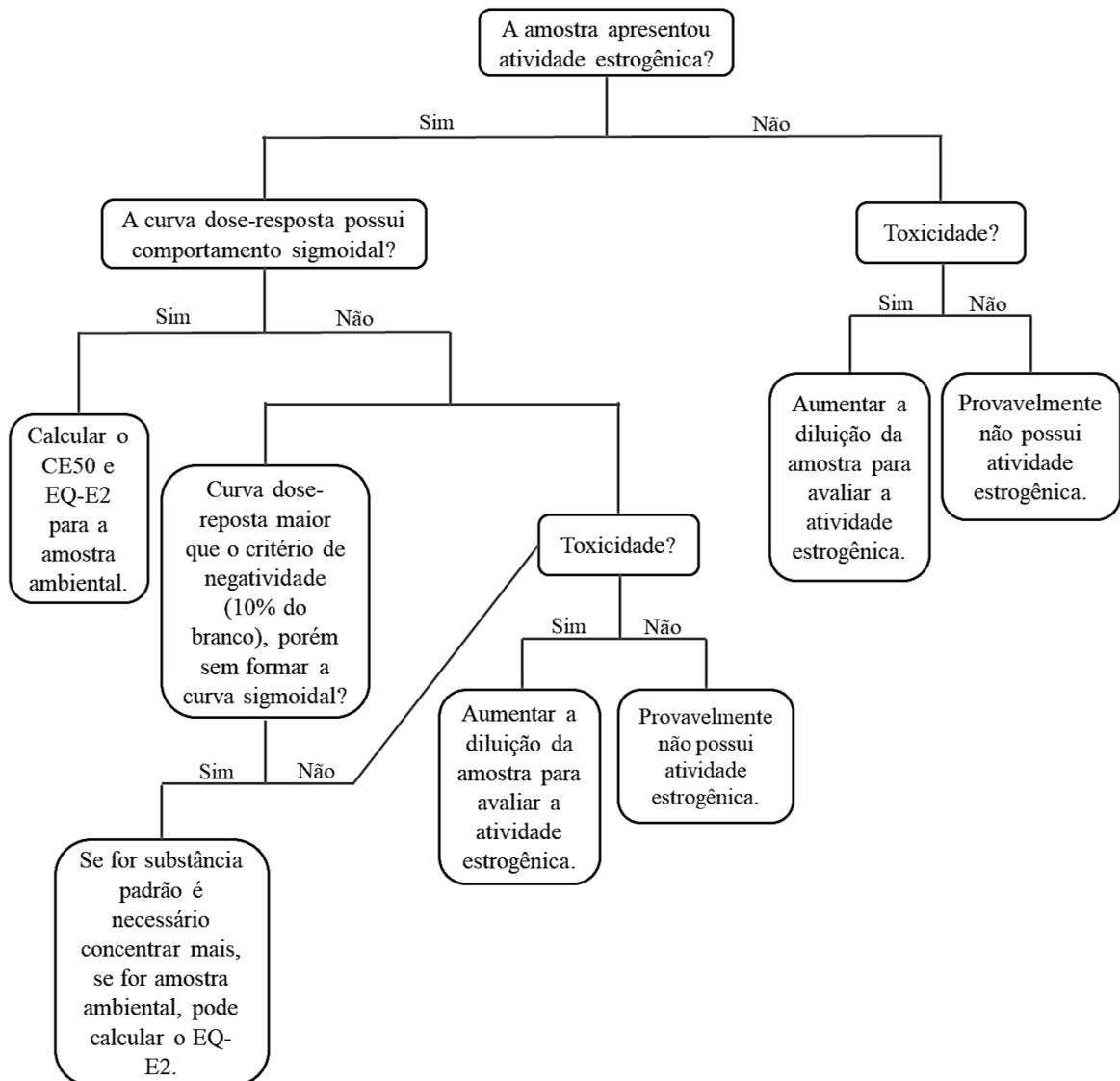
- Toxicidade < 0: o crescimento de células foi maior que na amostra do que no controle negativo, portanto, não há toxicidade;

- Toxicidade > 0: cresceram menos células nas amostras do que no controle negativo, logo, há toxicidade.

A Equação 7 foi aplicada ao primeiro poço, onde o extrato da amostra é 100% concentrado. Quando houve inibição do crescimento de levedura, a equação foi aplicada para os poços seguintes, até ser observada a ausência da inibição.

De forma geral, a expressão dos resultados de cada amostra, seguiu o fluxograma da Figura 12. Primeiro observa-se se há atividade estrogênica positiva e caso esta seja negativa verifica-se a presença de toxicidade, conforme a Equação 12, caso tenha, a amostra era mais diluída e caso não tenha, provavelmente a amostra não é estrogênica ou esta encontra-se abaixo do LD. Se a amostra possui resposta estrogênica positiva, calcula-se o CE50 para amostras padrões e para amostra ambiental o EQ-E2. Se a amostra não possui curva de comportamento sigmoideal, mas apresente uma resposta maior que o critério de negatividade (10% do controle negativo), é possível prosseguir com o cálculo do EQ-E2, se for substância padrão é preciso prepará-la mais concentrada a fim de calcular o CE50.

Figura 12 – Resumo das etapas antes do cálculo da concentração EQ-E2 de cada amostra.



Fonte: Adaptado de Gomes (2015).

4.4.2 Parâmetros operacionais da ETE

Para análise da eficiência do tratamento, foram consideradas as concentrações de entrada e saída do efluente doméstico, sendo calculado pela Equação 8.

$$E = \frac{(S_0 - S)}{S_0} * 100 \quad (8)$$

Onde,

E: eficiência de remoção;

So: concentração total na entrada;

S: concentração total na saída.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) do TA foi determinado por meio da Equação 9, segundo Von Sperling (2016).

$$TDH = \frac{V}{Q} \quad (9)$$

Onde,

V: volume do decantador secundário;

Q: vazão afluyente.

4.4.3 Diluição do corpo hídrico receptor

A concentração final da atividade estrogênica (C_f) presente no corpo hídrico receptor foi determinada por meio da Equação 10.

$$C_f = \frac{(Q_c \times C_r) + (C_{ef} \times Q_{ef})}{(Q_c + Q_{ef})} \quad (10)$$

Onde,

C_f : concentração final de atividade estrogênica;

C_r : concentração residual de atividade estrogênica;

C_{ef} : concentração de atividade estrogênica no efluente tratado;

Q_c : vazão do corpo hídrico;

Q_{ef} : vazão do efluente na saída da ETE.

Como vazão do corpo receptor foi utilizada a Q_{90} , que é definida como uma vazão de permanência, ou seja, reflete a vazão que é igualada ou superada 90% do tempo. A vazão de referência estabelece um valor de vazão limite de captação da água de mananciais. É com base neste valor que geralmente são implementados os sistemas de outorga. O dado foi obtido na estação fluviométrica Juiz de Fora – Jusante (nº 58480500), que se localiza nas coordenadas 21° 46' 43.65" S e 43° 19' 32.57" W, a jusante da área urbana do município com área de contribuição de aproximadamente 970 km². A medição para o cálculo da Q_{90} foi realizada entre 1975 e 2020.

A C_r representa a concentração estrogênica presente no corpo receptor no ponto de lançamento do efluente tratado, oriunda de outras atividades. Para tal, foi considerada como 0,

pois não foram encontrados dados sobre a caracterização do corpo receptor nesse trecho. A C_{ef} foi estimada a partir da atividade estrogênica determinada no efluente tratado durante o período de monitoramento. Foram calculadas as concentrações mínima, mediana e máxima.

4.4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 8 (Statsoft, 2007). A identificação de *outliers* foi realizada por meio do método de *Tukey* (1977), também conhecido como método *boxplot*. O método é baseado no intervalo entre percentis, valores fora do intervalo estabelecido são classificados como *outliers*, estabelecidos por meio das Equações 11, 12 e 13.

$$IQR = Q_3 - Q_1 \quad (11)$$

$$LI = Q_1 - 1,5 \cdot IQR \quad (12)$$

$$LS = Q_3 + 1,5 \cdot IQR$$

(13)

Onde:

Q_1 : corresponde ao percentil 25, ou seja 25% dos dados possuem valores que são menores ou iguais a Q_1 ;

Q_3 : corresponde ao percentil 75, ou seja 75% dos dados possuem valores que são menores ou iguais a Q_3 .

Posteriormente, foram calculadas as médias da atividade estrogênica das duplicatas de cada amostra por coleta. Dados abaixo do LD, também conhecidos como dados censurados à esquerda ou não detectados, são resultados de baixo nível que não podem ser medidos com precisão por um método analítico. Para as amostras com concentrações quantificadas acima do LD e a respectiva repetição com valor abaixo do LD foi atribuída a última, o valor do LD dividido por 2, assim como recomendado por Helsel (2006). Para amostras da mesma coleta analisadas em diferentes ensaios com amostra com atividade estrogênica positiva e

respectivas repetições abaixo do LD, foi atribuída a média dos LD obtidos para o cálculo da média final.

Foi verificada a normalidade da função por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, onde avaliou-se o p-valor em relação à significância (5%) adotada. Em seguida, foi realizada a análise de variância, pelo teste T de *Student*, caso os dados seguissem a distribuição normal e do teste de *Mann-Whitney*, caso contrário. Para avaliar desvios relacionados a sazonalidade os dados foram agrupados em períodos de estiagem (abril a setembro) e de chuva (outubro a março).

Para identificar possíveis correlações da ocorrência de atividade estrogênica no esgoto com SST, DQO (total e filtrada), N-NH₃, NTK, NO₃⁻ e nitrogênio orgânico foi realizado o teste de correlação de *Spearman*. Onde, conforme Hopkins (2016): $0 < r < 0.3$ (baixa), $0.3 < r < 0.5$, (moderada), $0.5 < r < 0.7$ (forte), $0.7 < r < 0.9$ (muito forte), $0.9 < r < 1.0$ (extremamente forte).

4.5 DESCARTE DE RESÍDUOS

Para inativação da levedura utilizada no ensaio YES, após a leitura das placas, estas foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos antes do descarte, assim como as ponteiras utilizadas e demais materiais plásticos. Da mesma forma, todo resíduo líquido ou sólido contendo a levedura foi autoclavado antes de ser descartado, seguindo o protocolo de biossegurança.

Os resíduos líquidos contendo hormônio foram armazenados em vidro para que fosse realizada a posterior coleta de resíduos especiais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos pela caracterização físico-química e pelo ensaio YES, em efluente sanitário bruto e tratado por LAAP em uma ETE situada na zona da mata mineira.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química do efluente sanitário bruto e tratado foi realizada a fim de avaliar o desempenho da ETE e subsidiar a interpretação dos resultados de atividade estrogênica.

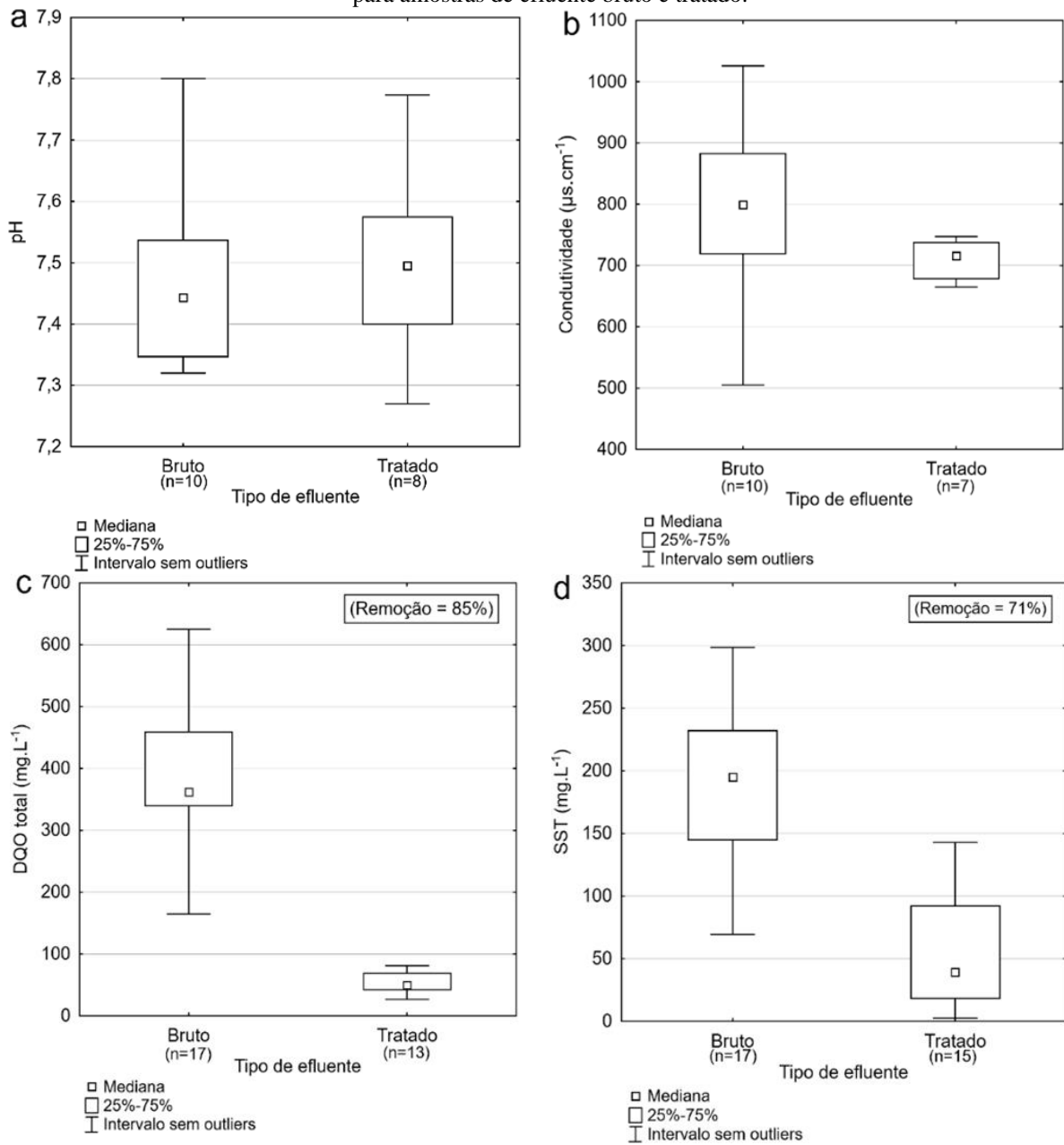
Na Tabela 11 apresentam-se as concentrações esperadas para os principais parâmetros físico-químicos de caracterização do esgoto bruto, segundo a literatura. Nas Figuras 13 e 14 apresentam-se os gráficos *box and whisker* dos parâmetros físico-químicos para o efluente bruto e tratado, cuja estatística descritiva está presente no APÊNDICE A. Nas Figuras 15 e 16, encontram-se os os gráficos *box and whisker* dos parâmetros físico-químicos para o efluente bruto, nos períodos de chuva e estiagem.

Tabela 11 – Composição característica do esgoto bruto.

Referências / Parâmetros	Von Sperling (2016)	Jordão e Pessôa (2017)
	Mín - Máx	Mín - Máx
pH	6,7 - 7,5	6,5 - 7,5
Demanda química de oxigênio (DQO) (mg.L ⁻¹)	400 - 800	200 - 800
Sólidos suspensos totais SST (mg.L ⁻¹)	200 - 450	120 - 360
Nitrogênio total (mg.L ⁻¹)	35-70	20 - 85
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) (mg.L ⁻¹)	20 - 40	10 - 50
Nitrogênio orgânico (mg.L ⁻¹)	15-30	10 - 35
Nitrito (NO ₂ ⁻) (mg.L ⁻¹)	Aprox. 0	0 - 0,10
Nitrato (NO ₃ ⁻) (mg.L ⁻¹)	0 - 2	0,10 - 0,40

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

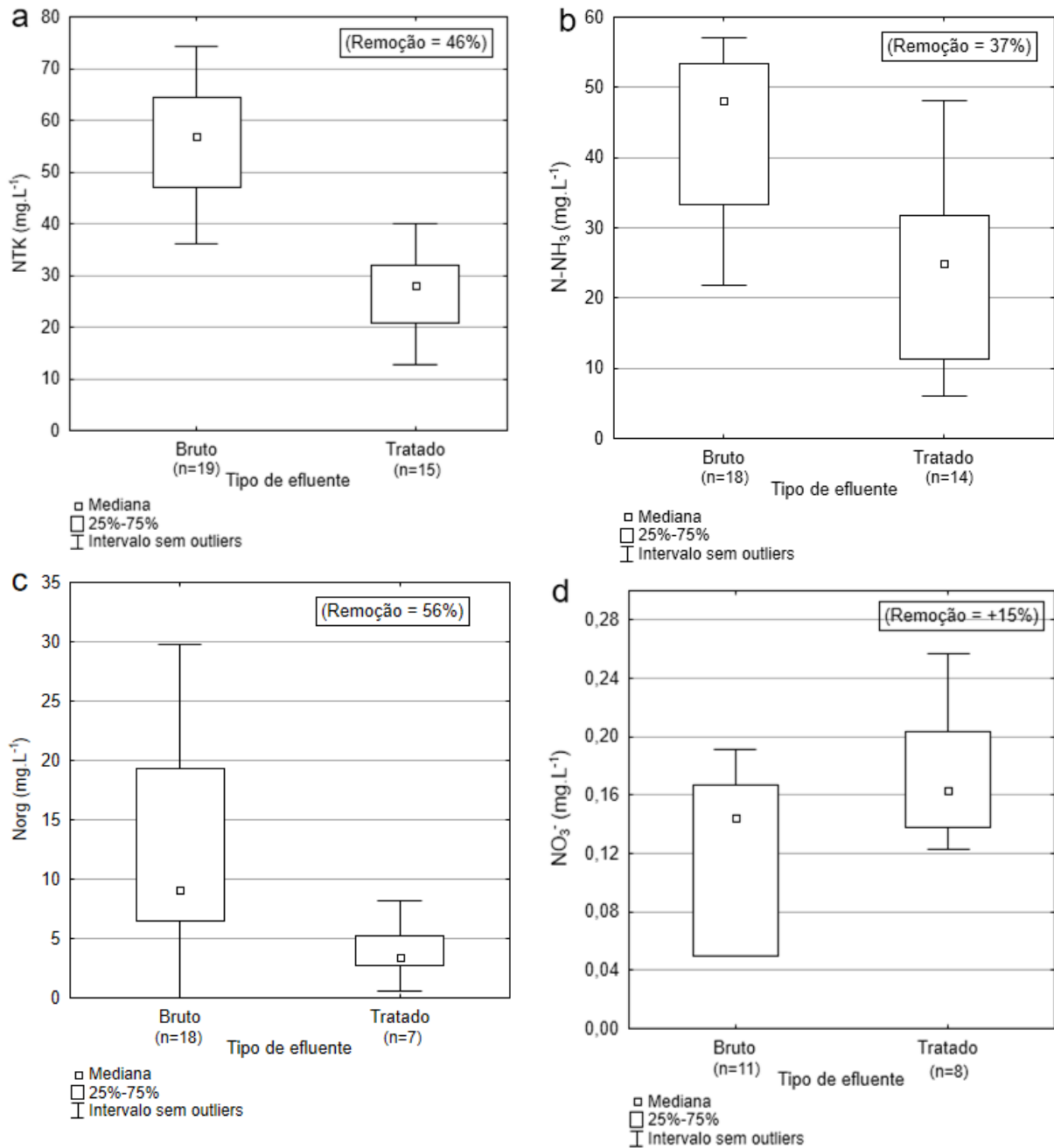
Figura 13 – Gráficos *box and whisker* dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, DQO total e SST) para amostras de efluente bruto e tratado.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: n (número de dados); demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos suspensos totais (SST).

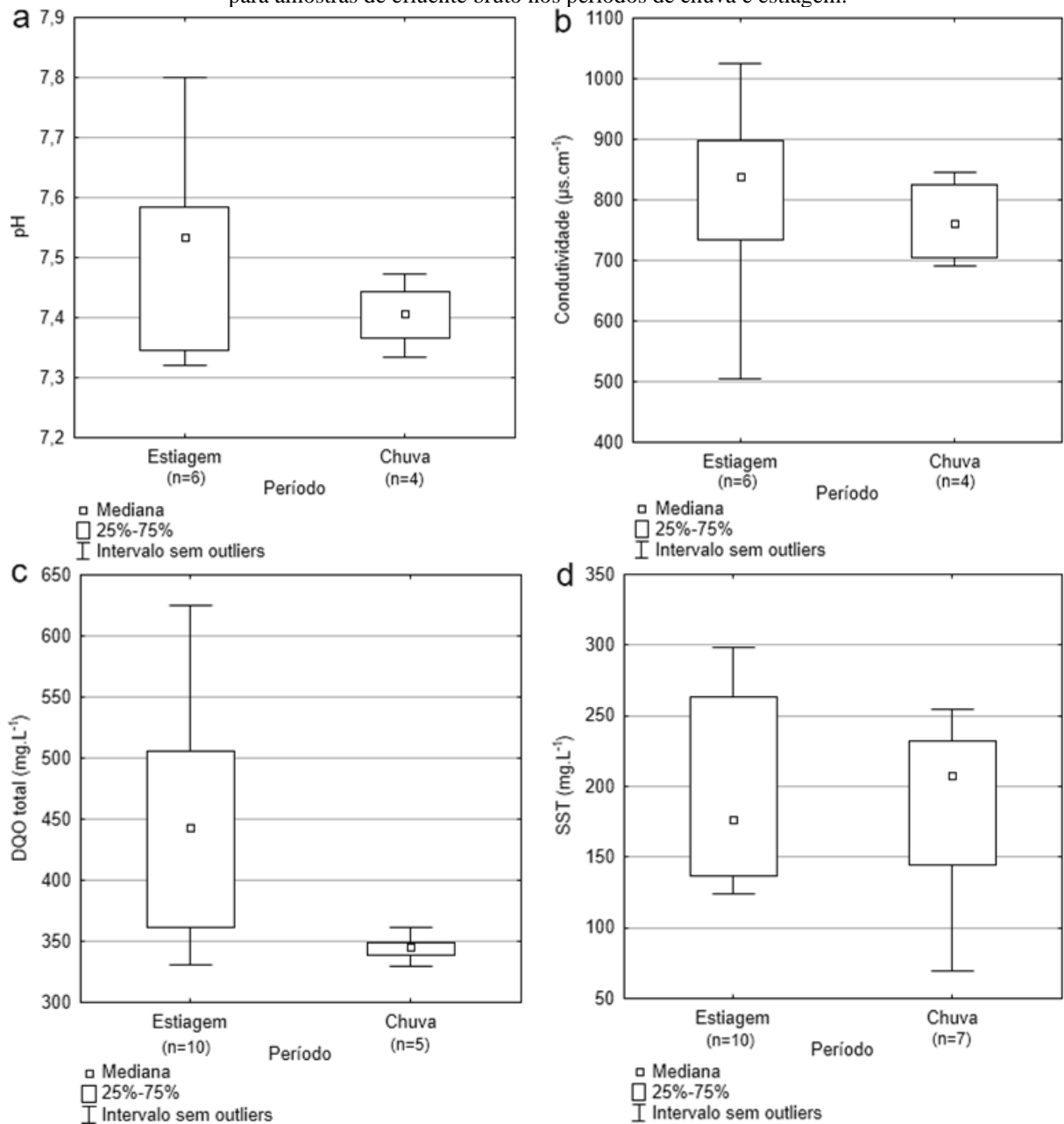
Figura 14 - Gráficos *box and whisker* dos parâmetros físico-químicos (NTK, N-NH₃, Norg e NO₃⁻) para amostras de efluente bruto e tratado.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: n (número de dados); nitrogênio total *kjeldahl* (NTK); nitrogênio amoniacal (N-NH₃); nitrogênio orgânico (Norg) e nitrato (NO₃⁻).

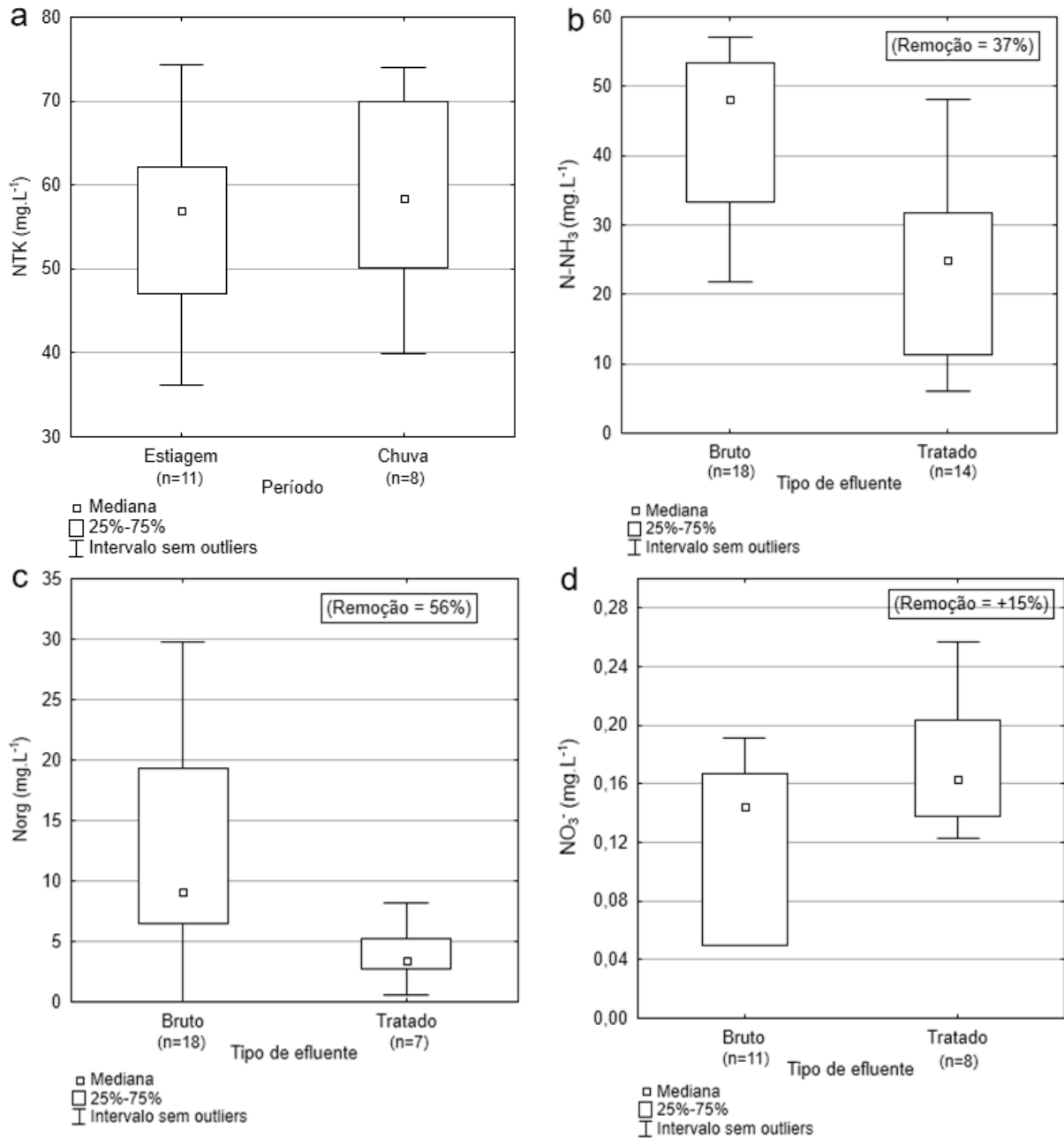
Figura 15 - Gráficos *box and whisker* dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, DQO total e SST) para amostras de efluente bruto nos períodos de chuva e estiagem.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: n (número de dados); demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos suspensos totais (SST).

Figura 16 - Gráficos *box and whisker* dos parâmetros físico-químicos (NTK, N-NH₃, Norg e NO₃⁻) para amostras de efluente bruto nos períodos de chuva e estiagem.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: n (número de dados; nitrogênio total *kjeldahl* (NTK); nitrogênio amoniacal (N-NH₃); nitrogênio orgânico (Norg) e nitrato (NO₃⁻).

De acordo com Von Sperling (2016), o parâmetro DQO apresenta-se abaixo da faixa esperada, enquanto N-NH₃ está acima. SST apresenta-se ligeiramente inferior a faixa reportada para Jordão e Pessoa (2017), enquanto o nitrogênio orgânico está abaixo do esperado para ambos os autores. O recebimento de água pluvial no sistema coletor juntamente com o esgoto doméstico pode justificar as concentrações abaixo do comum. O efluente bruto,

em geral apresenta composição característica de esgoto doméstico e se classifica como esgoto médio, conforme a classificação quanto a carga orgânica proposta por Jordão e Pessôa (2017).

Dentre os parâmetros avaliados no efluente tratado que são regulamentados pela Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH 8/2022 (Minas Gerais, 2022), todos apresentaram valores abaixo dos VMP para o lançamento de efluentes domésticos, com exceção do N-NH₃. As indicações da DN COPAM/CERH 8/2022 são: DQO total inferior a 180 mg.L⁻¹ ou eficiência de remoção de no mínimo 55% e média anual igual ou superior a 65%; concentração de SST de até 100 mg.L⁻¹ ou remoção de 90%; N-NH₃ inferior a 20 mg.L⁻¹; e pH entre 5,0 e 9,0.

Quanto a influência da precipitação na composição do esgoto bruto, verificou-se que os parâmetros DQO total e N-NH₃ são os únicos que sofreram influência significativa (teste e p-valor no APÊNDICE B). Observa-se que a variação das concentrações dos parâmetros possui maior amplitude no período de estiagem, com exceção de SST e NO₃⁻. Tal fato pode estar associado ao fato do sistema de coleta da ETE não possuir sistema separador de águas pluviais, que ao entrar no sistema promovem a diluição das concentrações.

O pH (Figura 13a) no efluente tratado, $7,50 \pm 0,02$, manteve-se dentro da faixa recomendada pela DN COPAM/CERH 8/2022 (Minas Gerais, 2022). Os valores encontrados para o parâmetro estão de acordo com resultados encontrados em outras ETEs brasileiras, entre 6,97 e 7,34 no efluente bruto (Andrade, 2019; Brito, 2021; Couto, 2019; Magalhães, 2012) e no tratado entre 7,0 e 7,21 (Brito, 2021; Couto, 2019). Para remoção do material carbonáceo é ideal que o pH esteja entre 6 e 9, assim como para evitar danos nas tubulações e tanques, uma vez que baixos valores podem causar a corrosão e altos valores podem levar a formação de incrustações (Metcalf e Eddy, 2016; Von Aperling, 2018).

Os valores medianos para condutividade elétrica (Figura 13b) obtidos no efluente bruto e no tratado foram de $800 \pm 141 \mu\text{s.cm}^{-1}$ e $716 \pm 30 \mu\text{s.cm}^{-1}$, respectivamente. Magalhães (2012), encontrou valores inferiores para este parâmetro no efluente bruto de $576 \mu\text{s.cm}^{-1}$, assim como Albuquerque (2012), de $461 \mu\text{s.cm}^{-1}$. A condutividade elétrica expressa a capacidade de transmissão de corrente elétrica no meio, sendo uma indicação da concentração de sais dissolvidos (Silva, 2007). Valores elevados de condutividade podem ser um problema no tratamento do efluente, pois altas concentrações de cátions podem prejudicar na agregação biológica dos flocos, resultando em uma má sedimentação do lodo no decantador secundário e assim, deteriorar a qualidade do efluente final (Murdoch, Gurakan e Sanin, 2008).

A DQO total (Figura 13c) apresentou concentrações medianas de $362 \pm 106 \text{ mg.L}^{-1}$ e $50 \pm 17 \text{ mg.L}^{-1}$, no efluente bruto e no tratado, respectivamente. O valor encontrado no efluente bruto está próximo ao reportado em outros estudos de caracterização de esgotos domésticos: entre 123 e 697 mg.L^{-1} (Albuquerque, 2012; Andrade, 2019; Brito, 2021; Lima, 2021; Magalhães, 2012; Martins Júnior, Silva e Benetti, 2021; Teixeira, 2016). Observa-se que a DQO no efluente bruto sofre variações, além dos fatores que em geral influenciam na composição do esgoto, tal fato pode ser atribuído ao recebimento de efluentes não-domésticos para tratamento, levando o incremento de carga orgânica.

A remoção média para DQO total foi de 85%, conforme esperado para sistemas LAAP, entre 85 e 95% (Von Sperling, 2016). A alta remoção de DQO também foi observada por Martins Junior, Silva e Benetti (2021), que avaliaram uma ETE LAAP em Porto Seguro – RS, cujas remoções de DQO foram de 83 e 88%, com concentrações finais de 40 e 50 mg.L^{-1} . Assim como Brito (2021) e Lima (2021), que avaliaram duas ETE LA e encontraram eficiências de cerca de 90%, com concentrações efluentes de 61 mg.L^{-1} e 68 mg.L^{-1} , nessa ordem. É esperado que sistemas LA e suas variantes alcancem altas eficiências de remoção de matéria orgânica, entre 85 e 90%.

Ainda que a DQO tenha tido influência significativa da precipitação na concentração do efluente bruto, a remoção não foi afetada e atendeu ao VMP em todas as coletas, padrão estável de remoção também observado por Saliba e Von Sperling (2017) para LAAP. Em uma ETE LAAP tratando esgoto doméstico no município de Paço do Lumiar – MA, sem tanque de equalização, Couto (2019), obteve a remoção média de 34% para DQO, com alta variação de remoção entre as coletas. Segundo Von Sperling, Verbila e Oliveira (2020), sistemas de tratamento simples operam melhor com vazões constantes. Para tal, a ETE em estudo possui um tanque de equalização, o que não é comum para sistemas LAAP, sendo assim, é esperado que ela suporte variações de cargas sem impactar de forma significativa na qualidade do efluente.

A concentração mediana de SST no esgoto bruto (Figura 13d), de $195 \pm 64 \text{ mg.L}^{-1}$, está dentro da faixa encontrada em outros esgotos domésticos, entre 63 e 335 mg.L^{-1} (Albuquerque, 2012; Couto, 2019; Lima, 2021; Magalhães, 2012). Apesar da concentração mediana de SST no efluente tratado, de $39 \pm 44 \text{ mg.L}^{-1}$, atender a DN COPAM-CERH nº 8/2022, houve três coletas que ultrapassaram o VMP, com os respectivos valores de 135, 102 e 143 mg.L^{-1} , datadas de 5/4/22, 2/5/22 e 16/5/22. Observa-se que nas duas primeiras coletas, as concentrações de SST no efluente bruto foram de 203 e 296 mg.L^{-1} . Tal fato pode estar

associado ao maior aporte de sólidos causado pela precipitação antecedente as três coletas, de 38,4, 4,8 e 1,0 mm, respectivamente. O aumento da vazão causa o aumento da velocidade do líquido, levando ao arraste dos sólidos presentes no decantador secundário, saindo juntamente com o efluente tratado.

A ETE recebe outros efluentes para tratamento com periodicidade não-regular, o que muda a composição do esgoto e pode acrescentar sólidos ao efluente. Também foi observado que a remoção de SST nas três coletas foi de 34%, 66% e 18%, todas abaixo da remoção média, de 71%, que também é inferior ao esperado para sistemas para LA e suas variantes, entre 85 e 95%, segundo Von Sperling (2016) e Jordão e Pessôa (2017). Baixas remoções de sólidos estão relacionadas principalmente a questões de formação e gerenciamento do lodo (Von Sperling, 2016).

Quanto ao nitrogênio, observa-se que ocorre a redução do nitrogênio orgânico (Figura 14c) após a entrada do efluente no tratamento, caracterizando o processo de amonificação. A nitrificação é o processo em que organismos quimiossintetizantes, utilizam a amônia como fonte de energia, convertendo-a em nitrito (NO_2^-), e posteriormente transformando-o em NO_3^- (Von Sperling, 2016). Este processo também foi observado pela redução de N-NH₃ (Figura 14 b) e de NTK (Figura 14a) e aumento da concentração de NO_3^- (Figura 14d).

O parâmetro NTK apresentou concentração mediana de $57,0 \pm 11,0 \text{ mg.L}^{-1}$, no efluente bruto. Este valor é condizente considerando a faixa reportada em outros estudos de efluentes sanitários no Brasil, entre 19,2 e 76,0 mg.L^{-1} (Albuquerque, 2012; Lima, 202; Magalhães, 2012; Teixeira, 2016). A concentração mediana de N-NH₃ no efluente bruto, de $48,1 \pm 11,8 \text{ mg.L}^{-1}$, é superior à faixa relatada em outros estudos, variando entre 19,2 e 48,0 mg.L^{-1} (Albuquerque, 2012; Couto, 2019; Magalhães, 2012; Martins Júnior, Silva e Benetti, 2021). A concentração de nitrogênio orgânico mediana encontrada foi de $9,1 \pm 9,3 \text{ mg.L}^{-1}$, valor semelhante ao encontrado por Magalhães (2012), de 13 mg.L^{-1} . A maioria dos autores associou as concentrações elevadas de nitrogênio e DQO ao recebimento de efluentes não-sanitários.

No efluente tratado, a concentração mediana para N-NH₃, de $25,0 \pm 12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, é superior ao VMP para lançamento de efluentes, de 20 mg.L^{-1} . Considerando sistemas LAAP, a remoção média de N-NH₃ calculada, de 38%, é inferior a faixa esperada, entre 90 e 95%, segundo Von Sperling (2016). Lima (2021) também encontrou baixa remoção de nitrogênio total (NT) em uma ETE LA situada em Brasília – DF, remoção de 17%, inferior à deste estudo e com concentração para nitrogênio total (NT) de 59 mg.L^{-1} . Outras ETES LA

brasileiras apresentaram um bom desempenho na remoção de N-NH₃. Para ETEs LAAP, Couto (2019) e Martins Junior, Silva e Benetti (2021) encontraram remoções de 89%, 94% e 93%, com respectivas concentrações finais de 6,58 mg.L⁻¹ e 2,33 e 3 mg.L⁻¹. A ETE do primeiro estudo situada em Paço do Lumiar - MA, e a do segundo em Porto Alegre – RS. Ambos os estudos indicam que é possível alcançar altas remoções e obter baixas concentrações de N-NH₃ no efluente tratado, desde que a ETE tenha boas condições operacionais e de gerenciamento do lodo.

Diversos fatores interferem no processo de nitrificação, como pH, temperatura, presença de substância tóxicas ou inibidoras e concentração de OD (Von Sperling, 2016).

A faixa de pH entre 7,5 e 8,0 é ideal para que a taxa de nitrificação seja ótima, sendo abaixo de 7 prejudicial no crescimento das bactérias nitrificantes (Metcalf e Eddy, 2016). O pH no TA esteve na média de 6,82 no período de calor e, de 7,07, nos meses frios. Observa-se que para os meses quentes, o pH esteve abaixo do ideal para o processo de nitrificação.

A temperatura interfere nas atividades metabólicas dos microrganismos e nas taxas de transferência de gás e nas características de sedimentação dos sólidos biológicos (Metcalf e Eddy, 2016). Para *Nitrosomonas*, a faixa ideal de temperatura está entre 30 e 36°C, com crescimento ótimo em 35°C; para *Nitrobacter*, a taxa varia entre 8 e 28°C, com crescimento ótimo em 28°C (NOCKO, 2008). Temperaturas abaixo de 15°C reduzem a atividade de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (COX, 2010). As temperaturas médias dos meses frios e quentes foram em torno de 21,93 °C e 24,1 °C, respectivamente. As temperaturas encontradas estão abaixo do ideal para o ótimo crescimento das bactérias nitrificantes. Podem ser adotadas medidas que busquem elevar a temperatura do tanque de aeração, como o aquecimento do mesmo.

Segundo a ABNT NBR 12.209/2011 (ABNT, 2011), a concentração de OD no TA deve ser superior a 1,5 mg.L⁻¹, para Metcalf e Eddy (2016), deve ser mantida entre 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹. As concentrações médias de OD estimadas nos meses frios e quentes são em torno de 1,21 mg.L⁻¹ e 1,17 mg.L⁻¹ respectivamente. Ou seja, esse foi um fator considerado limitante para o processo de nitrificação, juntamente com a temperatura. O baixo teor de OD na massa líquida pode estar associado a oxigenação ou injeção de ar insuficiente devido a problemas de dimensionamento, operação ou manutenção do equipamento ou mesmo pode ter a transferência de OD limitada devido a alta concentração de sólidos em suspensão no reator (SSTA).

Substâncias tóxicas ou inibidoras podem prejudicar o crescimento de bactérias nitrificantes que são mais sensíveis (Von Sperling, 2016). A ETE recebe outros efluentes para tratamento, como lixiviado de aterro sanitário, lodos de fossa séptica e efluente de banheiro químico, recebendo assim maior aporte de carga orgânica e toxicidade (Fernandes e Dias, 2021).

Nas ETEs em que ocorre nitrificação, Von Sperling (2016), ressalta que é importante que se realize a desnitrificação para que melhore aspectos operacionais (economia de energia na aeração, economia de alcalinidade, operação do decantador secundário) e a qualidade do efluente final (evitar ressuspensão do lodo e controle de eutrofização). O lançamento de nitrogênio em corpos d'água, pode intensificar a proliferação de fitoplânctons, juntamente com floração de cianobactérias, fenômeno conhecido como eutrofização. Esse fenômeno leva ao aumento da turbidez dos corpos d'água, levando a condições anaeróbias no fundo do corpo hídrico, gerando maus odores e o consumo do oxigênio dissolvido do meio líquido, e por consequência, prejudica o processo de fotossíntese podendo levar a perda de habitats e a morte de diversas espécies aquáticas (Jordão e Pessôa, 2017; Von Sperling, 2018). Ademais, a amônia livre é diretamente tóxica para os peixes, ainda que em baixas concentrações (Von Sperling, 2018).

O nível de confiança de uma ETE é baseado no conhecimento do comportamento das variações das concentrações dos parâmetros no efluente tratado (Metcalf e Eddy, 2016). Além disso, as concentrações de entrada e saída foram significativas ao nível de 5% para os parâmetros SST, DQO total, solúvel e particulada; N-NH₃, NTK, nitrogênio orgânico e NO₃⁻ (p-valores no APÊNDICE C). A ETE estudada conseguiu atender os VMPs referentes aos parâmetros presentes na DN COPAM-CERH nº 8/2022, mesmo em situações de altas concentrações, com exceção do N-NH₃, cuja mediana que superou o VMP em 57% das coletas. Segundo Von Sperling (2016), sistemas LAAP são resistentes a variações de carga e a presença de cargas tóxicas, além de suportar bem mudanças de ordem climática.

5.2 ENSAIO YES

5.2.1 Avaliação qualitativa

Um total de 38 amostras foram avaliadas quanto a atividade estrogênica no ensaio, sendo 20 de efluente bruto e 18 de efluente tratado. Adicionalmente, foram realizados

controles positivos, seis amostras dopadas com E2 (50, 100 e 500 ng.L⁻¹), e controles negativos, seis amostras compostas por água destilada apenas.

Das seis amostras de branco avaliadas nenhuma apresentou atividade estrogênica positiva, validando todos os ensaios realizados. Uma das curvas de branco encontra-se no APÊNDICE D. O resumo dos dados qualitativos das amostras de efluente doméstico bruto e tratado encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação qualitativa da atividade estrogênica das amostras de efluente bruto e tratado de cada coleta.

Coleta	Tipo de amostra			
	Bruto		Tratado	
23/05/2019	EB-1	-	ET-1	-
03/07/2019			ET-2	-
30/07/2019	EB-3	+	ET-3	+
14/08/2019	EB-4	+	ET-4	-
18/09/2019	EB-5	+	ET-5	+
14/10/2019	EB-6	+	ET-6	-
11/11/2019	EB-7	+	ET-7	+
06/02/2020	EB-8	+	ET-8	+
09/03/2020	EB-9	-	ET-9	+
07/12/2021	EB-10	+		
25/04/2022	EB-11	+		
02/05/2022	EB-12	+	ET-12	+
06/06/2022	EB-13	+		
20/06/2022	EB-14	+	ET-14	+

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: EB (esgoto bruto), ET (esgoto tratado), + (atividade estrogênica positiva), - (atividade estrogênica abaixo do LD).

Das amostras analisadas, 85% das amostras de esgoto bruto apresentaram atividade estrogênica, enquanto as de tratado, 50%.

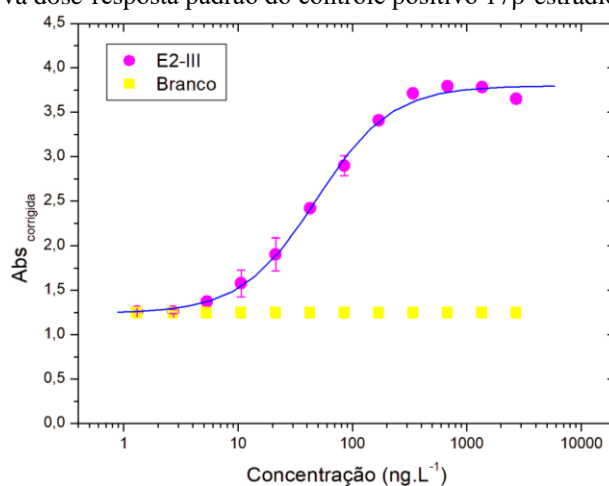
Quanto as amostras dopadas com E2, apenas as duplicatas respectivas a concentração de 100 ng.L⁻¹, foram possíveis de quantificar. As demais não apresentaram curva com comportamento sigmoidal e observou-se a presença de citotoxicidade, necessitando de maior diluição e a realização de um novo ensaio.

5.2.2 Avaliação quantitativa

5.2.2.1 Controle positivo 17 β -estradiol

Foi determinada para cada ensaio uma curva dose-resposta do controle positivo 17 β -estradiol, como na Figura 17, produzida na faixa de 2.724 ng.L⁻¹ a 1,3301 ng.L⁻¹.

Figura 17 – Curva dose-resposta padrão do controle positivo 17 β -estradiol no ensaio YES.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Ao todo foram realizados 10 ensaios com o controle positivo, com CE50 de $84,11 \pm 172,29$ ng.L⁻¹. O valor mediano encontrado é superior ao reportado por Argollo (2022), de 39,4 ng.L⁻¹, e por Barcellos (2016), de 48,5 ng.L⁻¹. Contudo, grande amplitude nos valores também foi observado por Gomes (2020), com valores de CE50 entre 35 e 303 ng.L⁻¹. Todas as curvas do controle positivo apresentam-se no APÊNDICE E. Observa-se que todas apresentaram comportamento sigmóide.

Foi elaborada a carta-controle para o controle-positivo, e ela apresenta-se no APÊNDICE F. Apenas um ensaio ficou fora do limite superior estimado por meio do desvio padrão. Contudo, optou-se por manter o *outlier* pois os resultados das amostras de efluente doméstico deste ensaio, referentes a uma duplicata EB-V e uma duplicata ET-V, apresentaram atividade estrogênica com concentrações em conformidade com suas respectivas duplicatas, analisadas em outro ensaio, com outra solução de E2. Apesar do alto desvio, percebe-se uma maior uniformidade no CE50 ao longo do tempo, principalmente a partir do quarto ensaio. Sabe-se que a CE50 sofre a influência de diversos fatores físicos e químicos, bem como das

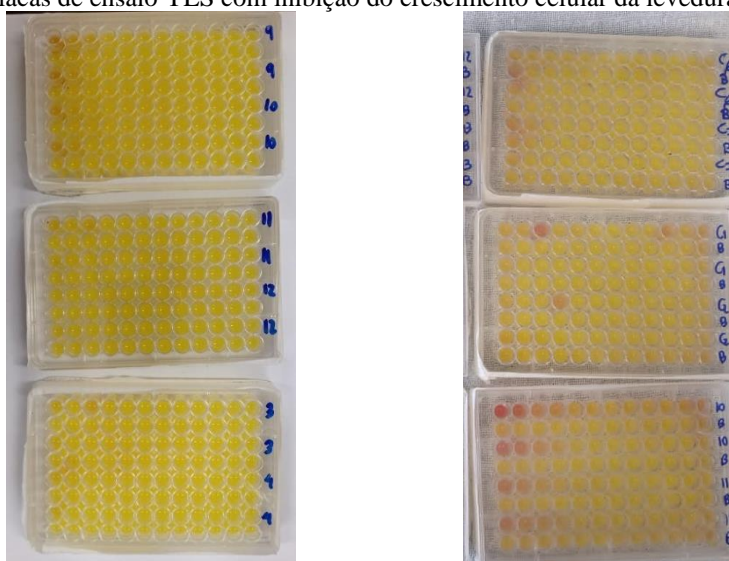
condições do ensaio, densidade celular, tempo de incubação e a experiência do operador (Hettwer *et al.*, 2018). Também cabe ressaltar que foram realizados poucos ensaios.

5.2.2.2 Inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por toxicidade da amostra

Alguns estudos, como o conduzido por Argollo (2022) e Gomes (2015), observaram inibição do crescimento, ou citotoxicidade, da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante o período de incubação do ensaio. Tal comportamento é regularmente associado a presença de toxicidade na amostra estudada. Bistan *et. al* (2011) destacam que este comportamento é mais frequente quando se analisa amostras extraídas de efluente de esgoto sanitário.

Visualmente, algumas amostras desse estudo apresentaram toxicidade, provocando a inibição do crescimento da levedura no ensaio YES e ausência/pouca cor mesmo nas amostras com a curva padrão E2 (Figura 18).

Figura 18 – Placas de ensaio YES com inibição do crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Acervo pessoal (2023).

Inicialmente foram descartadas as amostras cuja curva padrão E2 não apresentou cor, pela impossibilidade de calcular o EQ-E2. Posteriormente, nas amostras viáveis foi aplicada a Equação 7, descrita por Frische *et al.* (2009), onde ele utilizou o controle da absorbância a 620 nm para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido a toxicidade das amostras. A inibição do crescimento da levedura foi determinada no extrato da amostra 100%, correspondente ao 1º poço da placa de ensaio, e quando se observou toxicidade nesse poço,

aplicou-se nos poços seguintes até que a inibição não fosse mais observada (Tabela 13). As amostras marcadas em negrito foram descartadas devido a toxicidade e os valores em negrito representam poços em que houve inibição do crescimento da levedura.

Tabela 13 – Citotoxicidade nas amostras de efluente sanitário analisadas (continua).

Data da coleta	Amostra	Toxicidade											
23/05/2019	EB-I	0,40 -0,01 0,04 -0,07 -0,07 0,05 -0,03 0,01 -0,14 0,05 -0,06 -0,03											
		0,37 0,04 0,13 0,13 0,15 0,17 0,05 0,03 0,15 0,06 0,20 -0,09											
		0,96 0,88 -0,04 -0,08 -0,04 -0,13 -0,12 0,03 -0,08 -0,16 0,05 -0,02											
		0,97 0,44 0,19 0,18 0,10 0,14 0,16 0,14 0,03 0,07 0,17 0,01											
ET-I	0,06 0,01 0,08 0,08 0,03 0,03 0,01 0,09 -0,01 0,01 0,05 -0,03												
	0,32 0,10 0,10 0,14 0,07 0,12 0,09 0,11 0,04 0,02 -0,05 -0,20												
03/07/2019	EB-I	0,94 0,95 -0,40 -0,08 0,03 0,06 0,11 -0,01 -0,03 -0,02 0,07 0,00											
		0,18 -0,08 0,06 0,10 0,03 0,19 -0,05 0,04 0,03 -0,03 0,07 0,15											
	ET-II	0,21 -0,16 -0,11 -0,07 0,03 0,07 0,03 -0,06 0,06 -0,19 0,03 -0,08											
		-0,10 0,09 -0,08 -0,15 -0,07 0 -0,19 0,01 0,01 -0,09 0,11 0,06											
30/07/2019	EB-III	0,08 0 -0,17 -0,14 0,01 -0,12 0,05 -0,01 0,02 -0,03 0,04 -0,04											
		0,10 0,03 0,21 0,05 0,06 0,04 0,11 0,07 0,09 0,06 0,07 0,06											
	ET-III	0,06 -0,08 0,05 0,07 0 0,07 0,06 0,00 0,02 -0,04 0,05 -0,32											
		0,09 0,08 0,13 0,16 0,09 0,06 0,05 0,14 0,10 0,09 0,13 -0,01											
14/08/2019	EB-IV	-0,20 -0,13 0,13 0,12 0,07 0,08 0,13 0,06 0,10 0,06 0,10 -											
		-0,42 0,23 0,22 0,22 0,24 0,25 0,24 0,23 0,21 0,23 0,24 -											
		0,18 0,04 0,05 0,17 0,10 -0,03 0,06 0,08 0,00 0,12 0,13 -											
	0,13 0,17 0,17 0,11 0,12 0,04 0,11 0,11 0,05 0,07 0,12 -												
ET-IV	-0,11 0,03 0,08 0,02 -0,02 0,02 0,05 -0,10 0,01 0,05 -0,03 -0,05												
	-0,04 -0,09 -0,06 -0,02 -0,05 -0,04 -0,07 -0,05 -0,07 -0,12 -0,05 0,12												
	-0,09 -0,07 -0,08 0 -0,03 -0,02 0,07 -0,03 -0,09 0,09 0,13 0,95												
	0,08 0,05 0,03 0,12 0,19 0,09 0,05 0,07 0,12 -0,01 0,19 0,06												
18/09/2019	EB-V	-0,10 -0,04 -0,01 -0,24 -0,30 -0,25 -0,23 -0,26 -0,14 -0,13 -0,22 0,05											
		0,05 0 -0,01 0,04 -0,11 -0,02 0,19 0,04 0,02 -0,02 0 0,07											
	ET-V	-0,18 -0,02 -0,04 0,11 -0,12 -0,09 -0,10 0 -0,07 0,04 0,08 0,05											
		-0,12 0,03 0,06 0,01 0,04 0,03 0,22 0,13 -0,02 0,08 0,12 0,02											
14/10/2019	EB-VI	-0,10 -0,08 -0,04 0,06 0,06 0,00 0,04 -0,02 0,06 0,08 -0,10 -0,13											
		-1,00 0,08 0,10 0,10 0,05 0,08 0,07 0,16 0,19 -0,06 0 0,04											
	ET-VI	0,94 0,94 0,69 0,07 0,04 -0,05 0,04 -0,26 -0,22 0,05 0,01 -0,09											
		0,94 0,95 0,77 0,32 0,13 0,31 0,23 0,24 0,21 0,26 0,31 -0,11											
06/02/2020	EB-VIII	-0,14 -0,25 -0,26 -0,27 -0,18 -0,35 -0,29 -0,35 -0,31 -0,41 -0,09 -0,01											
		-0,08 -0,16 -0,07 0,01 -0,03 -0,01 -0,06 0,02 0,05 -0,11 -0,07 -0,07											
		0,30 -0,35 -0,24 -0,18 -0,06 -0,19 -0,26 -0,35 -0,35 -0,03 0,41 0,06											
	-0,22 -0,42 -0,07 -0,11 -0,03 -0,05 0,06 0,05 0,03 0,02 0,02 -0,02												
-0,25 -0,23 0,04 -0,06 -0,06 0,08 0,04 0,06 -0,12 -0,07 -0,06 -0,06													
-0,05 -0,14 0,15 0,19 0,25 0,10 0,20 0,07 0,18 0,20 0,07 -0,01													
ET-VIII	-0,16 -0,16 -0,09 -0,10 -0,02 0,17 -0,08 -0,03 -0,06 0,01 0,05 -0,01												
	-0,02 0,10 0,24 0,02 -0,05 0,29 0,24 0,31 0,32 0,31 0,23 -0,06												
	0,07 -0,18 -0,28 -0,49 -0,24 -0,09 -0,09 -0,24 -0,23 -0,07 -0,07 0,01												
	0,08 -0,08 -0,09 -0,03 -0,15 -0,22 -0,02 -0,07 0,01 -0,07 0,03 -0,02												
09/03/2020	EB-IX	-0,45 -0,43 -0,37 -0,35 -0,19 -0,28 -0,32 -0,20 -0,28 -0,11 -0,10 -0,01											
		0,21 -0,16 -0,15 -0,08 -0,13 -0,07 -0,10 -0,05 0,01 0,06 0,02 0,01											
		0,20 -0,06 -0,14 -0,14 -0,10 -0,08 -0,11 -0,38 -0,35 -0,08 -0,26 -0,15											
		0,75 -0,25 -0,15 -0,18 -0,37 -0,20 -0,09 -0,05 -0,04 -0,08 -0,07 0,01											

Tabela 13 - Citotoxicidade nas amostras de efluente sanitário analisadas (continuação).

Data da coleta	Amostra	Toxicidade											
09/03/2020	ET-IX	0,78	-0,24	-0,02	-0,09	-0,11	-0,12	-0,15	-0,06	-0,26	-0,27	-0,25	0,04
		0,04	-0,15	-0,06	-0,06	-0,07	-0,02	-0,09	-0,07	-0,03	0,01	-0,02	-0,04
		-0,01	-0,17	-0,07	-0,11	-0,10	-0,03	-0,17	0,01	-0,04	-0,04	-0,02	-0,05
		0,16	-0,09	-0,02	0,06	-0,11	-0,11	0,07	-0,30	0,03	0,14	0,20	-0,01
07/12/2021	EB-X	-0,16	0,05	0,14	-0,02	-0,09	-0,26	0	-0,23	-0,04	0,13	0,06	0,20
		-0,15	-0,04	0,06	-0,03	-0,20	-0,13	-0,23	-0,69	-0,13	-0,12	-0,04	0,08
25/04/2022	EB-XI	0,03	0,03	-0,03	-0,02	-0,23	0	0,14	-0,04	0,04	0,13	0,06	-0,02
		0,05	0,04	-0,10	0,05	0,02	0,01	0,15	0,08	0,03	-0,04	0,11	0,03
02/05/2022	EB-XII	-0,38	0	-0,09	0,27	-0,12	0,03	0,01	-0,49	0,15	-0,17	0,08	-0,05
		0,04	-0,04	0,02	0,09	0,14	0,21	0,05	0,15	0,08	0,16	0,05	-0,12
	ET-XII	0,06	-0,12	-0,14	-0,11	0,10	-0,04	0,10	0,07	-0,17	-0,05	0	-0,09
		0,02	0,05	0,08	0,06	-0,06	-0,03	-0,01	-0,03	-0,11	0	-0,14	0,05
06/06/2022	EB-XIII	0,11	-0,17	-0,24	0,04	-0,12	-0,01	-0,05	-0,11	-0,10	-0,23	-0,02	-0,08
		-0,33	-0,19	-0,06	0,08	0,08	-0,05	-0,26	-0,14	-0,13	-0,31	-0,12	0,01
20/06/2022	EB-XIV	-0,07	-0,05	0,17	-0,05	0,03	0,01	-0,06	-0,06	0,03	0,08	0,02	0,11
		0,03	-0,16	-0,01	-0,01	0,07	0,04	0	0,04	0,13	0,06	0,06	0,03
		-0,11	-0,11	-0,05	-0,06	-0,10	-0,06	0,06	-0,13	-0,16	-0,10	-0,13	0,11
	-0,11	-0,02	-0,12	-0,13	-0,15	0	0,05	0,02	-0,04	-0,06	-0,18	-0,11	
	ET-XIV	-0,19	-0,04	0,10	-0,01	0	-0,03	0,03	0,01	0,10	-0,06	-0,11	0,01
		-0,03	0,04	0,08	-0,09	-0,19	0,04	-0,02	0,06	0,05	0	-0,07	-0,06

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para alguns casos foi observada toxicidade em todos os poços, e nesse caso não possível determinar a atividade estrogênica (amostras em negrito na Tabela 13). Observa-se que, ainda que possível determinar a atividade estrogênica, as amostras apresentaram toxicidade em diversos poços.

A inibição do crescimento da levedura durante a incubação do ensaio pode acarretar em resultados falsos negativos no ensaio YES, pois se não há levedura para que a substância estrogênica se ligue no Reh e desencadeie a indução da β -galactosidase que irá degradar o CPRG em CPR, ainda que a amostra tenha compostos estrogênicos não será possível a detecção e quantificação desses DEs. Também pode ocorrer a menor quantificação de estrogenicidade quando ocorre a inibição parcial do crescimento da levedura. Para reduzir a toxicidade da amostras, um das soluções indicadas é aumentar a diluição da amostra no ensaio. Todavia, não é possível usar a amostra sem a concentração da SPE, pois a concentração dos compostos pode não estar acima do limite de detecção do ensaio.

5.2.2.3 Recuperação e limites de detecção e quantificação (LD e LQ)

A amostra dopada contendo E2 na concentração de 100 ng.L⁻¹ apresentou recuperação de aproximadamente 84%. A curva de recuperação para concentração de 100 ng.L⁻¹ encontra-

se no APÊNDICE G. Considera-se a porcentagem de recuperação da amostra boa, pois todas encontram-se dentro da faixa considerada aceitável, entre 40 e 120%, de acordo com os critérios para validação de métodos analíticos do INMETRO (2020). Ademais, a recuperação é próxima aos valores encontrados por outros autores para o mesmo processo de extração (Argolo, 2022; Gomes, 2020; Sun *et al.*, 2017).

Todavia, optou-se por não aplicar o fator de recuperação no cálculo da concentração final, pois a orientação (INMETRO, 2020) recomenda a utilização da média de três concentrações distintas que representem os valores, baixo, médio e alto conforme os limites de quantificação do método utilizado.

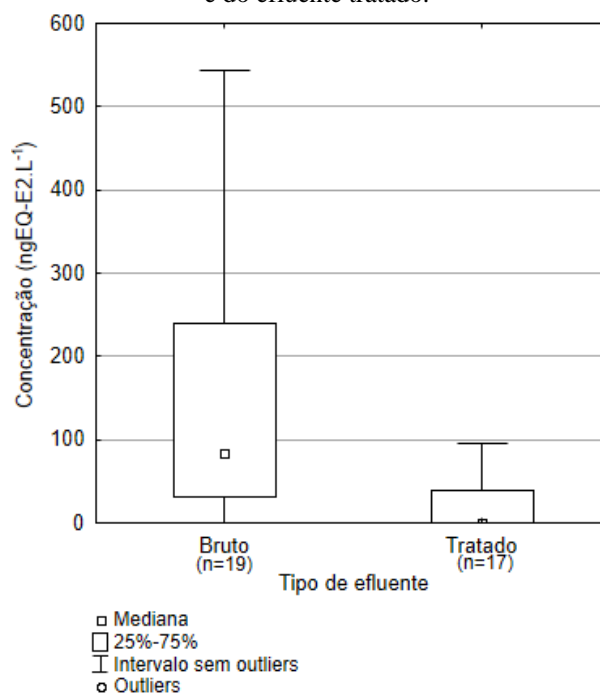
Os valores de LD calculados ficaram entre 0,10 e 0,22 ngEQ-E2.L⁻¹ e de LQ entre 0,29 e 0,66 ngEQ-E2.L⁻¹. Os valores médios para LD e LQ foram de $0,15 \pm 0,05$ e $0,44 \pm 0,14$ ngEQ-E2.L⁻¹, respectivamente.

5.2.2.4 Avaliação da atividade estrogênica

Após a aplicação do método de *Tukey* foram identificados dois *outliers*, um para o efluente bruto (761,40 ngEQ-E2.L⁻¹) e um para o efluente tratado (120,80 ngEQ-E2.L⁻¹), ambos acima dos limites superiores. Esses *outliers* foram excluídos do cálculo da medida de tendência central, sendo no total 19 amostras de efluente bruto e 17 de efluente tratado utilizadas para tal finalidade.

A estatística descritiva para a atividade estrogênica nas amostras de efluente bruto e de efluente tratado está presente no APÊNDICE H. As concentrações estrogênicas de cada duplicata e suas respectivas médias e LD e LQ obtidos de cada amostra de efluente bruto e tratado encontram-se no APÊNDICE I. A atividade estrogênica mediana obtida para o efluente bruto foi de $83,96 \pm 147,20$ ngEQ-E2.L⁻¹, e para o efluente tratado foi de $<LD \pm 28,65$ ngEQ-E2.L⁻¹. No gráfico *box and whisker* presente na Figura 19 observa-se a distribuição dos dados de concentração estrogênica para o efluente bruto e para o efluente tratado.

Figura 19 – Gráfico *box and whisker* das concentrações de atividade estrogênica (ngEQ-E2.L⁻¹) do efluente bruto e do efluente tratado.



Ao se comparar a estrogenicidade do efluente bruto e do tratado, verificou-se que as amostras se desviam significativamente ao nível de significância adotado de 5% (teste e p-valor no APÊNDICE J). Isso indica que o tratamento do efluente doméstico por LAAP da ETE estudada é significativo na remoção da atividade estrogênica.

O *outlier* da amostra de efluente bruto é referente a coleta de 11/11/2019. Nessa coleta, as eficiências de remoção de DQO, SST e N-NH₃ se encontram dentro do esperado, e o efluente tratado conforme aos parâmetros da legislação pertinente. Sendo assim, isso indica que no período a ETE operava dentro da normalidade. Entretanto, observa-se concentração elevada de N-NH₃ e NTK para efluentes domésticos, de 51,4 mg.L⁻¹ e 60,8 mg.L⁻¹, respectivamente, o que pode indicar a descarga de outros tipos de efluentes, que possam ter influenciado na concentração estrogênica afluente.

A amostra de efluente tratado identificada como *outlier* é referente a coleta de 20/06/22, ela foi superior ao LS determinado. Nessa coleta foi observada a maior concentração de NTK (36,1 mg.L⁻¹) e de N-NH₃ (31,8 mg.L⁻¹) no efluente tratado, com respectiva remoção de N-NH₃ de 28,54%, um dos valores mais baixos de remoção quando comparados as demais coletas. Von Sperling (2016), ressalta que as bactérias nitrificantes têm seu crescimento inibido na presença de substâncias tóxicas e em baixas taxas de oxigênio. Portanto, o comprometimento do processo de nitrificação é um indicativo da presença de

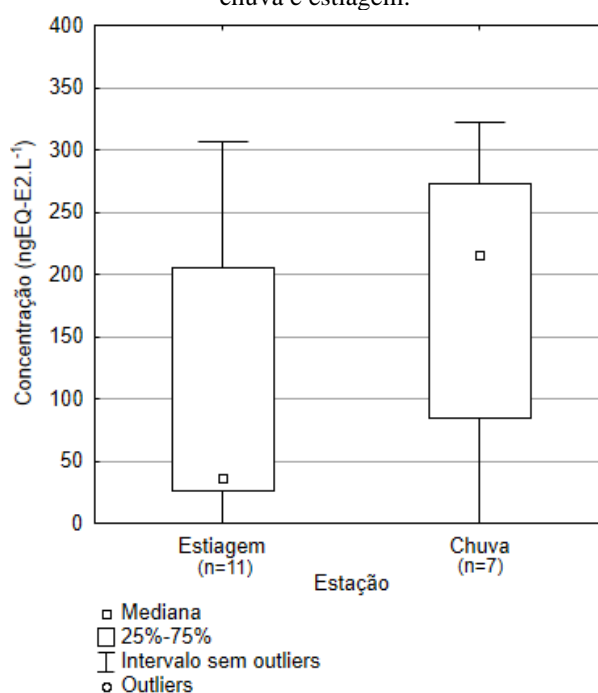
outras substâncias que podem interferir na quantificação do ensaio YES, bem como influenciar na composição da biomassa no TA e na agregação do lodo, e assim, impactar negativamente na remoção da atividade estrogênica.

Foi realizada a comparação entre os dados para os períodos de estiagem (abril a setembro) e de chuva (outubro a março). Observou-se um *outlier* no período de estiagem, cujo valor foi 543,90 ngEQ-E2.L⁻¹.

Na coleta referente ao resultado discrepante, datada de 25/04/22, foi observada a descarga de efluente oriundo de fossa séptica antes do ponto de amostragem do efluente bruto, antes da realização da coleta, ou seja, foi adicionado um maior aporte de esgoto não diluído, o que pode ter resultado em maior atividade estrogênica no efluente. Assim, este dado também foi retirado para determinar a medida de tendência central.

No gráfico *box and whisker* presente na Figura 20, observa-se a distribuição dos dados de concentração estrogênica para o efluente bruto nos períodos de estiagem e de chuva, com seus respectivos valores medianos, máximos e mínimos e intervalos interquartis (Q25 e Q75).

Figura 20 – Gráfico *box and whisker* da atividade estrogênica (ngEQ-E2.L⁻¹) no efluente bruto nos períodos chuva e estiagem.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Quanto a influência da precipitação na estrogenicidade do efluente, no período de estiagem, a concentração variou entre <LD e 306,8 ngEQ-E2.L⁻¹ e no período chuvoso entre

<LD e 322,27 ngEQ-E2.L⁻¹. O resumo dos parâmetros estatísticos para os dois períodos apresenta-se no APÊNDICE K.

No período de estiagem, apesar do menor valor mediano (36,95 ± 107,09 ngEQ-E2.L⁻¹), observa-se alta variabilidade dos dados em comparação com o período chuvoso (216,30 ± 110,79 ngEQ-E2.L⁻¹). Além disso, observa-se que 50% dos dados no período de estiagem encontram-se entre 26,55 e 205,67 ngEQ-E2.L⁻¹ e no período de chuva entre 83,96 e 272,30 ngEQ-E2.L⁻¹, indicando a proximidade das faixas de concentrações para os dois períodos. Assim, verificou-se que não há desvios significativos entre os períodos de chuva e estiagem, ao nível de significância adotado de 5% (teste t e p-valor no APÊNDICE J).

No estado do Rio de Janeiro, Argolo (2022) obteve no esgoto bruto valores entre 15 e 41,4 ngEQ-E2.L⁻¹, enquanto Barcellos (2016), entre 1,08 e 4,61 ngEQ-E2.L⁻¹. Para o mesmo estado, Gomes (2020) encontrou valores superiores, na faixa de <LD a 123,0 ngEQ-E2.L⁻¹. Lopes (2016) obteve valores entre 14,7 e 52,6 ngEQ-E2.L⁻¹ e 22,1 a 31,9 ngEQ-E2.L⁻¹, em duas ETEs localizadas na região metropolitana de São Paulo. Em ETEs internacionais, Petosa *et al.* (2022) encontraram concentrações entre 27 e 72 ngEQ-E2.L⁻¹ no Canadá, enquanto na Alemanha, Hettwer *et al.* (2018) quantificou a média de 13,9 ngEQ-E2.L⁻¹ e na Suíça, Margot *et al.* (2013) encontraram entre 37 a 100 ngEQ-E2.L⁻¹. A faixa encontrada nesse trabalho foi entre <LD e 543,90 ngEQ-E2.L⁻¹, atingindo valores superiores quando comparados com os dados de estudos citados localizados na região Sudeste do Brasil e no esgoto bruto internacional. Observa-se que a atividade estrogênica possui alta dispersão no efluente bruto, com CV de 98,68% e que 50% dos dados encontram-se entre 31,09 e 239,10 ngEQ-E2.L⁻¹. Mesmo assim, nota-se que metade das amostras ainda se encontram com valores mais elevados que todos os estudos citados.

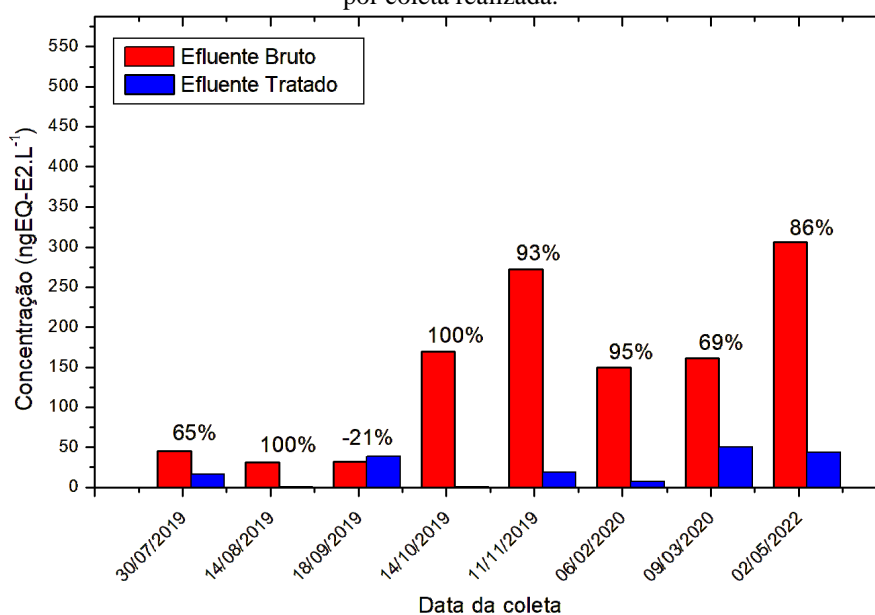
Cabe ressaltar que a quantificação da atividade estrogênica sofre a influência da complexidade da composição do esgoto, presença de substâncias antagonistas e tóxicas e a interação dos compostos entre si. A ETE recebe efluentes de outras tipologias, como mencionado no item anterior. Além disso, fatores regionais, espaciais e temporais, condições ambientais e o estilo de vida da população, como taxas reprodutivas, alimentação, consumo de água e medicamentos e as propriedades físico-químicas dos compostos também interferem nas concentrações dos microcontaminantes (Luo *et al.*, 2014).

Para a mesma tipologia de tratamento (LAAP), Gomes (2020) encontrou valores entre <LD e 11 ngEQ-E2.L⁻¹ para amostras de efluente tratado, inferiores as deste estudo. Para o tratamento por LA a faixa encontrada foi superior às encontradas por Argolo (2022), <LD a

28 ngEQ-E2.L⁻¹ e por Lopes (2016), entre 0,91 e 2,93 ngEQ-E2.L⁻¹ e 2,44 e 11 ngEQ-E2.L⁻¹. Em ETEs internacionais, foram encontrados os valores de 1 a 10 ngEQ-E2.L⁻¹ por Petosa *et al.* (2022) no Canadá, de 0,2 a 6,9 ngEQ-E2.L⁻¹ por Archer *et al.* (2020) na África do Sul, de 0,7 a 8,3 ngEQ-E2.L⁻¹ na Suíça, por Margot *et al.* (2013) e de 34,1 a 65,96 ngEQ-E2.L⁻¹ (Pawlowski *et al.*, 2004) e entre <LD e 1,0 ngEQ-E2.L⁻¹ (Shuliakovich *et al.*, 2022), as duas últimas na Alemanha.

Nota-se que, a faixa de estrogenicidade no efluente tratado deste trabalho foi superior que as encontradas em ETEs brasileiras e internacionais (Archer, 2020; Pawlowski *et al.*, 2004; Rutishauser *et al.*, 2004). Cerca de 50% dos valores encontram-se entre <LD e 39,44 ngEQ-E2.L⁻¹, sendo estes ainda superiores que aos encontrados nas ETEs brasileiras citadas e na maioria das ETEs internacionais. Na Figura 21 encontra-se as concentrações estrogênicas para o efluente bruto e para o tratado por coleta realizada.

Figura 21 – Gráfico das concentrações de atividade estrogênica (ngEQ-E2.L⁻¹) do efluente e do efluente tratado por coleta realizada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Observa-se que das dez coletas em que foram analisados os efluentes antes e após o tratamento, apenas em uma (18/09/2019) a concentração do tratado (31,75 ngEQ-E2.L⁻¹) foi superior à do bruto (38,74 ngEQ-E2.L⁻¹), correspondendo ao aumento de cerca de 21%. Contudo, após a realização do teste de *Tukey*, o dado foi identificado como um *outlier* e, portanto, foi excluído para o cálculo da média. A remoção média da atividade estrogênica obtida foi de 86%. Assim como nessa pesquisa, diversos estudos encontraram eficiências de

remoção da atividade estrogênica em torno de 90% pelo sistema de LA e suas variantes (Argolo, 2022; Coleman *et al.*, 2008; Leusch *et al.*, 2018; Lopes, 2016). Para ETEs com sistema LA, Argolo (2022) encontrou remoção média de 92%, Lopes (2016) de 80 e 90% e Margot *et al.* (2013) de 88%.

O valor discrepante de aumento da atividade estrogênica, de cerca 21%, na coleta de 18/09/2019, pode estar associado ao fato de o tratamento convencional remover alguns compostos que interferem na análise do ensaio YES, que podem inibir a atividade estrogênica atuando como antagonistas, ou seja quantificar uma menor ou nenhuma atividade que de fato está presente na amostra antes do processo de tratamento (Kolle *et al.*, 2010).

Neste estudo a remoção média foi de cerca de 37% para N-NH₃, com concentração no efluente final de $25 \pm 12,5$ mg.L⁻¹. Assim, a nitrificação foi um dos processos identificados com remoção abaixo do esperado para sistemas LAAP e isso pode ser um indicativo da presença de substâncias tóxicas ou de problemas no fornecimento ou dissolução de oxigênio na massa líquida. Segundo Gomes (2020), a toxicidade de algumas amostras pode reduzir as células viáveis e por consequência a resposta estrogênica, gerando resultados falso-negativos. Margot *et al.* (2013) avaliando a remoção da atividade estrogênica concluiu que ela foi dependente do nível de nitrificação, sendo de 75% sem a nitrificação e de 99% com nitrificação total (N-NH₃ <1 mg.L⁻¹). Além disso, apesar das amostras terem sido coletadas no mesmo dia e horário, não significa necessariamente que a amostra de esgoto tratada seja referente à amostra de esgoto bruto coletada, devido ao TDH.

Fornecimento insuficiente de OD e excesso de concentração sólidos na massa líquida que dificultam a dissolução de OD podem prejudicar a formação e agregação do lodo. A presença de lodo disperso e a saída de sólidos nos vertedores do decantador secundário foram observadas durante as coletas. A sorção é um dos principais mecanismos de remoção da atividade estrogênica nos esgotos, onde ocorre a transferência da fase dissolvida para a fase particulada (Argolo, 2022; Aquino *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2021). Gomes (2020) e Argolo (2022), encontraram resultados positivos analisando a fração particulada de diferentes matrizes ambientais, indicando a importância do estudo da estrogenicidade associada aos sólidos suspensos. Sendo assim, a saída de sólidos pode implicar no aumento da concentração estrogênica no efluente tratado e estar associada a menores eficiências de remoção estrogênica da fração líquida.

Além disso, nas matrizes aquosas pode ocorrer a desconjugação e a degradação parcial dos hormônios esteróides pela atuação das bactérias eliminadas juntamente com as excreções,

principalmente pela *Escherichia coli*, resultando no aumento da estrogenicidade (Baronti *et al.*, 2000; Esteban *et al.*, 2014; Fent, Weston e Caminada, 2006; Ternes *et al.*, 1999).

5.2.2.5 Correlação de Spearman entre os parâmetros físico-químicos e a atividade estrogênica

Foi realizado o teste de correlação de *Spearman* para identificar a existência de correlações entre atividade estrogênica e parâmetros físico-químicos (TDH, condutividade, pH, DQOtotal, SST, N-NH₃, NO₃⁻, NTK e Norg), em termos de concentração e eficiências de remoção. Para nenhum dos parâmetros o p-valor foi menor que 0,05, ou seja correlação não foi significativa.

5.2.2.6 Avaliação dos efeitos potenciais a vida aquática

As concentrações estrogênicas em águas superficiais capazes de causarem efeitos danosos ao ecossistema aquático variam entre os autores de 0,1 a 0,5 ngEQ-E2.L⁻¹ (Escher *et al.* 2008; Nelson *et al.* 2007). Já para Esteban *et al.* (2014) seria a partir de 1 ngEQ-E2.L⁻¹.

Para o cálculo das concentrações foi utilizada a Q₉₀ no valor de 10,03 m³.s⁻¹ e as concentrações mediana e máxima do efluente tratado, sendo estas de 0,11 ngEQ-E2.L⁻¹ e 95,48 ngEQ-E2.L⁻¹, respectivamente. A concentração da atividade estrogênica mediana ficou abaixo do LD, portanto, também foi considerada como mínima. Para vazão do efluente tratado foi utilizado o valor médio, de 45,35 L.s⁻¹. A concentração mediana e mínima determinada após o descarte do efluente tratado no corpo receptor é de 0,0005 ngEQ-E2.L⁻¹, e a máxima de 0,43 ngEQ-E2.L⁻¹.

Embora os valores de atividade estrogênica em águas superficiais não estejam normatizados em nenhum país, os resultados encontrados neste trabalho, sustentados pela literatura, demonstram um alerta para os possíveis riscos ao ecossistema aquático. Cabe ressaltar que, para mensurar os efeitos potenciais dos compostos estrogênicos é preciso medir a vazão no ponto de descarte de efluente, mensurar a capacidade de autodepuração e de adsorção aos sedimentos pelo corpo hídrico receptor e determinar a atividade estrogênica presente no corpo receptor oriunda de outros lançamentos, bem como sua origem e periodicidade de descarte e a sua variação de concentração. Sendo assim, tem-se aqui uma estimativa devendo realizar mais estudos.

6 CONCLUSÃO

Dentre os parâmetros avaliados no efluente tratado que são regulamentados pela legislação de Minas Gerais, todos apresentaram concentrações abaixo do VMP, com exceção do N-NH₃, sendo observada a extrapolação do VMP, em aproximadamente, 57% das coletas. A remoção média de DQO foi de 85%, conforme o esperado para sistemas LAAP. Quanto ao N-NH₃, a remoção foi de 48%, abaixo do esperado para essa tipologia de tratamento. Foram identificados como fatores limitantes para o processo no tanque de aeração, a temperatura e concentração de OD.

A precipitação influenciou de forma significativa na composição do esgoto bruto apenas para DQO total e N-NH₃ e o efluente bruto exibiu concentrações inferiores ao período de estiagem para a maioria dos parâmetros, com exceção do SST, NTK e nitrogênio orgânico. Não houve alteração significativa no tratamento entre as estações de chuva e estiagem, indicando regularidade no tratamento mesmo com o recebimento de águas pluviais, que foi associada a presença do tanque de equalização.

85% das amostras de efluente bruto apresentaram atividade estrogênica positiva, enquanto de efluente tratado, 50%. A atividade estrogênica mediana no efluente bruto foi de $83,96 \pm 147,20$ ngEQ-E2.L⁻¹, variando entre <LD e 543,90 ngEQ-E2.L⁻¹, e no efluente tratado de $<LD \pm 28,65$ ngEQ-E2.L⁻¹, variando entre <LD e 95,48 ngEQ-E2.L⁻¹. Houve desvio significativo entre as amostras antes e após o processo de tratamento, ao nível de significância de 5%. Quanto a sazonalidade, apesar de o período de chuva ter exibido concentrações de atividade estrogênica mais elevadas, a mediana não se desviou significativamente do período de estiagem.

Apesar da remoção média de 86% da atividade estrogênica estar dentro da faixa reportada pela literatura para sistemas LA e variantes, a atividade estrogênica no efluente bruto encontrada neste estudo foi superior à de outros efluentes domésticos no Brasil e de outros países, e por consequência a concentração após o tratamento também foi. As concentrações estrogênicas estimadas no corpo receptor após o lançamento do efluente tratado foram de 0,0005 ngEQ-E2.L⁻¹ e 0,43 ngEQ-E2.L⁻¹, respectivamente. A concentração máxima, está acima dos valores considerados como potenciais causadores de efeitos adversos ao ecossistema aquático.

Portanto, conclui-se que é necessário a adoção de medidas de controle quanto à compostos estrogênicos em todos os níveis, desde o seu uso racional para minimizar as

concentrações no esgoto, bem como a realização de mais pesquisas que contribuam para inclusão destes compostos como parâmetros de monitoramento de águas residuárias com o objetivo de fomentar a adoção de estratégias e de novas tecnologias que objetivem aumentar a sua remoção nas ETEs.

REFERÊNCIAS

- ADEEL, M.; SONG, Xiaoming; WANG, Yuanyuan; FRANCIS, Dennis; YANG, Yuesuo. Environmental impact of estrogens on human , animal and plant life : A critical review. **Environment International**, [S. l.], v. 99, p. 107-119, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>.
- AHMED, Mohammad Boshir; ZHOU, John L.; NGO, Huu Hao; JOHIR, Abu Hasan; SORNALINGAM, Kireesan. Sorptive removal of phenolic endocrine disruptors by functionalized biochar: competitive interaction mechanism , removal efficacy and application in wastewater. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 335, p. 801-811, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.041>.
- AKHTER, Afroza; RAHAMAN, Mostafizur; SUZUKI, Ryu to; MURONO, Yuki; TOKUMOTO, Toshinobu. Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues. **Heliyon**, [S. l.], v. 4, n. 9, 2018. DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00788.
- ALBUQUERQUE, Edilincon Martins de. **Avaliação do tratamento combinado de lixiviado de aterro sanitário e esgoto sanitário em sistema de lodos ativados**. 2012. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ANA (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO). Atlas Esgotos: Despoluição de Bacias Hidrográficas. Agência Nacional de Águas, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Brasília, 2017. 88p. Disponível em: <<http://atlasesgotos.ana.gov.br/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.
- ANDRADE, Higor Azevedo. **Avaliação de eficiência da estação de tratamento de esgoto ERQ Oeste Aracaju/SE**. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Civil), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão - SE, 2019.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION); AWWA (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION); WEF (WATER ENVIRONMENT FEDERATION). **Standard Methods**. 23. ed., 2015.
- APSEN. Destilbenol®. São Paulo – SP, 2018. Disponível em http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=38665etipo_doc=fi. Acesso em 22 de março de 2023.
- AQUINO, Sérgio Francisco de; BRANDT, Emanuel Manfred Freire; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013. DOI: 10.1590/S1413-41522013000300002.

ARCHER, Edward; WOLFAARDT, Gideon M.; VAN WYK, Johannes H.; VAN BLERK, Nico. Investigating (anti)estrogenic activities within South African wastewater and receiving surface waters: Implication for reliable monitoring. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 263, 2020. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114424.

ARGOLO, Allan dos Santos. **Influência da matéria orgânica e da interação de estrogênios na quantificação de atividade estrogênica e sua interferência em matrizes ambientais**. 2022. Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

ARGOLO, Allan dos Santos; GOMES, Giselle; BILA, Daniele Maia. Insights into total estrogenic activity in a sewage-impacted urban stream assessed via ER transcriptional activation assay: Distribution between particulate and dissolved phases. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 208, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111574>.

AZIZI, Dariush; ARIF, Ayman; BLAIR, David; DIONNE, Justine; FILION, OUARDA Yves; PAZMINO, Yassine; GISELL, Ana; PULICHARLA, Rama; RILSTONE, Victoria; TIWARI, Bhagyashree; VIGNALE, Leah; BRAR, Satinder Kaur; CHAMPAGNE, Pascale; DROGUI, LANGLOIS, Patrick; BLAIS, Valerie S.; FRANÇOIS, Jean. A comprehensive review on current technologies for removal of endocrine disrupting chemicals from wastewaters. **Environmental Research**, [S. l.], v. 207, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112196>.

AZZIZ, Ricardo; CARMINA, Enrico; CHEN, ZiJiang; DUNAIF, Andrea; LAVEN, Joop S. E.; LEGRO, Richard S.; LIZNEVA, Daria; NATTERSON-HOROWTIZ, Barbara; TEEDE, Helena J.; YILDZ, Bulent O. Polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v.2, n. 16057, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.57>

BARCELLOS, Mariana Macêdo. **Ocorrência de Hormônios Estrogênicos e Avaliação da Atividade Estrogênica de Esgoto Bruto e Tratado em uma ETE do Município do Rio de Janeiro (RJ)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Centro de Tecnologia e Ciências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

BARONTI, Chiara; CURINI, Roberta; D'ASCENZO, Guiseppa; DI CORCIA, Antonio; GENTILI, Alessandra; SAMPERI, Roberto. et al. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental science e Technology*, v. 34, n. 24, p. 5059-5066, 2000. <https://doi.org/10.1021/es001359q>

BERNARDELLI, Jossy Karla Brail. **Biodegradação de Estrona, 17B- Estradiol e 17A-Etinilestradiol em sistemas aeróbios de tratamento**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2014.

BESSE, Jean Philippe; GARRIC, Jeanne. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 157, n. 12, p. 3485-3494, 2009. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.06.012.

BICCHI, C.; SCHILIRÒ, T.; PIGNATA, C. ; FEA, E.; CORDERO, C.; CANALE, F.; GILLI, G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. **Science of the total environment**. v. 407, p. 1842-1851, 2009. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.039

BILA, Daniele Maia. Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização. 2005. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Tese (Doutorado), Rio de Janeiro, 2005.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007. DOI: 10.1590/s0100-40422007000300027.

BISTAN, Mirjana; PODGORELEC, Mojca; LOGAR, Romana Marinšek; TIŠLER, Tatjana. Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity in water bodies. **Food Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 427-433, 2012.

BOUWMAN, H. et al. Evidence of impacts from DDT in pelican, cormorant, stork, and egret eggs from KwaZulu-Natal, South Africa. **Chemosphere**, [S. l.], v. 225, p. 647-658, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.043.

BRANDT, Emanuel Manfred F.; AQUINO, Sérgio Francisco de; BASTOS, Rafael Kopschitz X. Revisão do Anexo XX da Portaria de Consolidação n o 5 de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde (antiga Portaria MS N° 2914 / 2011) Padrão de Potabilidade e Planos de Amostragem Substâncias Químicas – Fármacos e Desreguladores Endócrinos Subsídios. **Ministério da Saúde**, [S. l.], 2020.

BRASIL. Decreto n° 5472, de 20 de junho de 2005. Promulga o texto da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, adotada, naquela cidade, em 22 de maio de 2001. Brasília-DF, 20 de junho de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal. Portaria n° 357, de 14 de outubro de 1971. Proíbe o uso de organoclorados em pastagens. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília-DF, p. 22, 15 de outubro de 1971.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação n° 5, de 28 de setembro de 2017 – ANEXO XX. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 out. 2017. Seção 1, p. 360.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n° 888, de 4 de maio de 2021. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 mai. 2021. Seção 1, p. 127.

BURGOS-ACEVES, Mario Alberto; MIGLIACCIO, Vincenzo; DI GREGORIO, Ilaria; PAOLELLA, Gaetana; LEPRETTI, Marilena; FAGGIO, Caterina; LIONETTI, Lilla. 1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)-ethane (DDT) and 1,1-dichloro-2,2-bis (p, p'-chlorophenyl) ethylene (DDE) as endocrine disruptors in human and wildlife: A possible implication of mitochondria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 87, 2021. DOI: 10.1016/j.etap.2021.103684.

CÂMARA, José S.; MONTESDEOCA-ESPONDA, Sarah; FREITAS, Jorge; GUEDES-ALONSO, Rayco; SOSA-FERRERA, Zoraida; PERESTRELO, Rosa. Emerging

contaminants in seafront zones. Environmental impact and analytical approaches. **Separations**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1-25, 2021. DOI: 10.3390/separations8070095.

CAMPANHA, Mariele. B.; AWAN, Almas Taj, DE SOUSA, Diana N. R.; GROSSELI, Guilherme. M.; MOZETO, Antonio A.; FADINI, Pedro. S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 7936-7947, 2014. DOI: 10.1007/s11356-014-3929-x.

CAPALDO, Anna; GAY, Flaminia; VALIANTE, Salvatore; DE FALCO, Maria; SCIARRILLO, Rosaria; MADDALONI, Massimo; LAFORGIA, Vincenza. Endocrine-disrupting effects of nonylphenol in the newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). **Comparative Biochemistry and Physiology - Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 155, n. 2, p. 352-358, 2012. DOI: 10.1016/j.cbpc.2011.10.004.

CASERTA, Donatella; CARNEVALI, Oliana; TOSTI, Luca; SPECIALE, Claudia; PENG, Chun; ZHU, Yong; MARADONNA, Francesca. DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. **Gynecological Endocrinology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 1-7, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0010201.

ČERNÁ, Tereza; EZECHIÁŠ, Martin; SEMERÁD, Jaroslav; GRASSEROVÁ, Alena; CAJTHAML, Tomáš. Evaluation of estrogenic and antiestrogenic activity in sludge and explanation of individual compound contributions. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 423, 2022. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127108.

CESAMA - COMPANHIA DE SANEAMENTO MUNICIPAL. Plano de negócios. Juiz de Fora, Minas Gerais, 2018. Disponível em <https://cesama.com.br/ckfinder/files/PLANO%20DE%20NEG%C3%93CIOS%202022-2026%20v6_16-12-2021_FINAL_Intranet.pdf>. Acesso em 31 de julho de 2023.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). **DDT e derivados (DDE e DDD)**. São Paulo, p. 1-4, 2012. Disponível em <<https://www.cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/DDT>>. Acesso em 23 de maio de 2023.

CHANDRASEKAR, Gayathri; ARNER, Anders; KITAMBI, Satish Srinivas; DAHLMAN-WRIGHT, Karin; LENDAHL, Monika Andersson. Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 752-764, 2011. DOI: 10.1016/j.ntt.2011.09.009.

CHEVALIER, Nicolas; BRUCKER-DAVIS, Françoise; LAHLOU, Najiba; COQUILLARD, Patrick; PUGEAT, Michel; PACINI, Patricia; PANAÏA-FERRARI, Patricia; WAGNER-MAHLER, Kathy; FÉNICHEL, Patrick. A negative correlation between insulin-like peptide 3 and bisphenol A in human cord blood suggests an effect of endocrine disruptors on testicular descent during fetal development. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 447-453, 2015. DOI: 10.1093/humrep/deu340.

CHRISTODOULOU, A.; STAMATELATOU, K. Overview of legislation on sewage sludge management in developed countries worldwide. **Water Science and Technology**. v. 73, n. 3, p. 453-462, 2015. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.521>.

COELHO, Lucia Helena Gomes et al. Estrogenic Hormones in São Paulo Waters (Brazil) and Their Relationship with Environmental Variables and *Sinapis alba* Phytotoxicity. **Water, Air, and Soil Pollution**, [S. l.], v. 231, n. 4, 2020. DOI: 10.1007/s11270-020-04477-2.

COLEMAN, H. M. et al. Fate and analysis of endocrine disrupting chemicals in some sewage treatment plants in Australia. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 11, p. 2187-2194, 2008. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.573>

COMBARNOUS, Yves; DIEP NGUYEN, Thi Mong. Comparative overview of the mechanisms of action of hormones and endocrine disruptor compounds. **Toxics**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1-11, 2019. DOI: 10.3390/toxics7010005

COMISSÃO EUROPEIA. Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu. Estratégia Comunitária para Desreguladores Endócrinos, uma série de substâncias suspeitas de interferir nos sistemas hormonais dos seres humanos e da vida selvagem. Bruxelas, 17/12/1999.

COMISSÃO EUROPEIA. Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão, de 20 de março de 2015, que estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia* [notificada com o número C(2015) 1756]. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 78, 24/03/2015, p. 40-42; Bruxelas.

COMISSÃO EUROPEIA. Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2020. **Jornal Oficial da União Europeia**, [S. l.], v. 2019, p. 1–62, 2020.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Ministério do Meio Ambiente**, 2005.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). Resolução nº 396, de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 7 de abril de 2008.

CONAMA (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 União**, Brasília-DF, 2011.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). Resolução nº 498, de 19 de agosto de 2020, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA: Define critérios e procedimentos para produção e aplicação de bio sólido em solos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 161, 21 de agosto de 2020.

COPAM/CERH (CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DE MINAS GERAIS). Deliberação Normativa conjunta nº 8 de 8 de novembro de 2022. Dispõe sobre a

classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

Diário oficial do estado de Minas Gerais, Belo Horizonte -MG, 2 de dezembro de 2022.

COUTO, Lucas de Carvalho. **Estudo comparativo de eficiência no tratamento de esgoto sanitário por meio dos processos de lodo ativado e reator anaeróbio com pós-tratamento nos municípios de Paço do Lumiar e São José de Ribamar**. 2019. Monografia (Graduação em Engenharia Civil) – Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís-MA, 2019.

COX, M.J.F. **Desarrollo de una estrategia de operación para promover el proceso nitrificación: desnitrificación simultánea en un reactor secuencial de biopelícula**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Faculdade de Engenharia e Ciências, Universidad de La Frontera, Temuco, 2010.

CUNHA, Danieli Lima da ; MUYLAERT, Samuel; DO NASCIMENTO, Marilia Teresa Lima; DA SILVA, Giselle Gomes Moreira; DA FONSECA, Estefan Monteiro; BILA, Daniele Maia; SARCINELLI, Paula de Novaes; LARENTIS, Ariane Leites. Estrogenic activity of endocrine disruptors in the surface water of santa maria madalena, Southeastern Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 21-28, 2021. DOI: 10.1590/s1413-415220180133.

DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 5, n. December 2017, p. 156-163, 2018. DOI: 10.1016/j.toxrep.2017.12.025.

DELBES, G; BL´AZQUEZ, M.; FERNANDINO, J. I.; GRIGOROVA, P.; HALES, B. F.; METCLAFE, C.; NAVARRO-MARTÍN, L.; PARENT, L.; ROBAIRE, B.; RWIGEMERA, A.; VAN DER KRAAK, G.; WADW, M.; MARLATT, V. Effects of endocrine disrupting chemicals on gonad development: Mechanistic insights from fish and mammals. **Environmental Research**, [S. l.], v. 204, 2022. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112040.

DELCLOS, K. Barry; WEIS, Constance C.; BUCCI, Thomas J.; OLSON, Greg; MELLICK, Paul; SADOVOVA, Natalya; LATENDRESSE, John R.; THORN, Brett; NEWBOLD, Retha R. Overlapping but distinct effects of genistein and ethinyl estradiol (EE2) in female Sprague-Dawley rats in multigenerational reproductive and chronic toxicity studies. **Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 117-132, 2009. DOI: 10.1016/j.reprotox.2008.12.005.

DEMONEL, Ana Carolina Bazon; SANTOS, Maria de Fátima Pereira Dos; VICENTE, Maristela Araújo. Compostos Desreguladores Endócrinos Em Água: Uma Perspectiva Bibliométrica. **Brazilian Journal of Production Engineering**, [S. l.], p. 234-246, 2022. DOI: 10.47456/bjpe.v8i3.37988.

DIAS, Raissa Vitareli Assunção. **Avaliação da ocorrência de microcontaminantes emergentes em sistemas de abastecimento de água e da atividade estrogênica do estinilestradiol**. 2014. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2014.

DINIZ, Renata Borges. **Lodos ativados aplicados no tratamento de esgoto doméstico e industrial : avaliação de duas etes localizadas no município de juiz de fora - MG Lavras - MG**. 2021. Dissertação (Mestrado em Tecnologias e Inovações Ambientais), Programa de Mestrado Profissional em Tecnologias e Inovações Ambientais, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2021.

Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Diretivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**.

Diretiva 2013/39/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de agosto de 2013, que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. **Jornal Oficial da União Europeia**.

DODDS, E.C.; LAWSON, W. Synthetic Oestrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. **Nature**, v. 137, n. 996, 1936. <https://doi.org/10.1038/137996a0>

DONG, Xinwei; HE, Lingzhi; HU, Hui; LIU, Na; GAO, Song; PIAO, Yunxian. Removal of 17 β -estradiol by using highly adsorptive magnetic biochar nanoparticles from aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 352, p. 371-379, 2018. DOI: 10.1016/j.cej.2018.07.025.

DUONG, Cuong. Ngoc.; RA, Jin. Sung.; SCHLENK, Daniel.; KIM, Sang. D.; CHOI, Hoon. K.; KIM, Sang Don. Sorption of Estrogens onto Different Fractions of Sediment and Its Effect on Vitellogenin Expression in Male Japanese Medaka. *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 59, p. 147-156, 2010. DOI: 10.1007/s00244-009-9429-1.

DVOŘÁKOVÁ, Markéta; KEJLOVÁ, Kristina; BENDO VÁ, Hana; RUCKI, Marian; KOHOUT, Pavel; TOMEŠOVÁ, Jitka; VAVROUŠ, Adam; JÍROVÁ, Dagmar. Alternative methods in vitro for screening of endocrine disruptors. **Neuroendocrinology Letters**, [S. l.], v. 37, sup. 1, p. 123-131, 2016.

EHRlich, Shelley; WILLIAMS, Paige L.; MISSNER, Stacey A.; FLAWS, Jodi A.; BERRY, Katharine F.; CALAFAT, Antonia M.; YE, Xiaoyun; PETROZZA, John C.; WRIGHT, Diane; HAUSER, Russ. Urinary Bisphenol A Concentrations and Implantation Failure among Women Undergoing in Vitro Fertilization. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 120, n. 7, p. 978-984, 2012. DOI: 10.1289/ehp.1104307.

ENYOH, Christian Ebere; VERLA, Andrew Wirnkör; QINGYUE, Wang; OHIAGU, Franklyn Okechukwu; CHOWDHURY, Akhter Hossain; ENYOH, Emmanuel Chinedu; CHOWDHURY, Tanzin; VERLA, Evelyn Ngozi; CHINWENDU, Ugwuezumba Patrick. An overview of emerging pollutants in air: Method of analysis and potential public health concern from human environmental exposure. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 28, n. e00107, 2020. DOI: 10.1016/j.teac.2020.e00107.

EPHC/NRMMC/AHMC (Natural resources management ministerial council; environment protection and heritage council; national health and medical research council). Australian

guidelines for water recycling: Managing health and environmental risks (Phase 2) Augmentation of drinking water supplies. **National Water Quality Management Strategy**, [S. l.], n. Phase 2, p. 1-159, 2008.

ESCHER, B. I.; BRAMAZ, N.; QUAYLE, P.; RUTISHAUSER, S. K.; VERMEIRSEN, E. L. Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. **Journal of environmental monitoring: JEM**, v. 10, n. 5, p. 622–631, 2008. DOI: 10.1039/b800951a.

ESCHER, B.I.; STAPLETON, H.M.; SCHYMANSKI, E.L. Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. **Science**, p.367, n. 6476, p. 388-392, 2020. [https://doi.org/ 10.1126/science.aay6636](https://doi.org/10.1126/science.aay6636)

ESTEBAN, S.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 466-467, p. 939-951, 2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.101.

FARRÉ, Marinel La; PÉREZ, Sandra; KANTIANI, Lina; BARCELÓ, Damià. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 991-1007, 2008. DOI: 10.1016/j.trac.2008.09.010.

FENT, Karl; CHEW, Geraldine; LI, Jun; GOMEZ, Elena. Benzotriazole UV-stabilizers and benzotriazole: Antiandrogenic activity in vitro and activation of aryl hydrocarbon receptor pathway in zebrafish eleuthero-embryos. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 482-483, n. 1, p. 125-136, 2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.109.

FENT, Karl; WESTON, Anna A.; CAMINADA, Daniel. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 122-159, 2006. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009.

FERNANDES, Pedro Antônio Alves; EDGARD DIAS. **Análise de confiabilidade de uma ete de médio porte com sistema de lodos ativados com aeração prolongada**. In: Congresso da Associação Brasileira de Engenharia Ambiental e Sanitária – ABES, XXXI, 2021, Curitiba – PR: ABES, 2021. *Anais [...]* [S. l.], 2021.

FINCKH, Saskia et al. Endocrine disrupting chemicals entering European rivers: Occurrence and adverse mixture effects in treated wastewater. **Environment International**, [S. l.], v. 170, p. 107608, 2022. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107608.

FISCELLA, Kevin; FRANKS, Peter.; GOLD, Marthe. R.; CLANCY, Carolyn M. Inequality in quality: addressing socioeconomic, racial, and ethnic disparities in health care. **JAMA: Journal of the American Medical Association**. v. 283, p. 2579-2584, 2000. <https://doi.org/10.1001/jama.283.19.2579>.

FLORIPES, Túlio Cesar; DE AQUINO, Sérgio Francisco; QUARESMA, Amanda de Vasconcelos; AFONSO, Robson José de Cássia Franco; CHERNICHARO, Carlos Augusto

de Lemos; DE SOUZA, Cláudio Leite. Occurrence of drugs and endocrine disrupters in raw and treatment sewage in the city of Belo Horizonte / MG, Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 1199-1211, 2018.
DOI: 10.1590/s1413-41522018177703.

FONSECA, Yara Vanessa Portuguese. 2013. **Estudo sobre a ocorrência de poluentes emergentes na água do Rio Meia Ponte na cidade de Goiânia-GO**. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente), Programa de Pós-Graduação em Engenharia do Meio Ambiente, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2013.

FRANÇA, Júnior Farias de; PICKLER, Thaisa Borim; JOZALA, Angela Faustino; DOS SANTOS, Carolina Alves; BATISTA, Bruno Lemos; PEDRON, Tatiana; VIEIRA, Raquel Andrade Leite; GROTTTO, Denise. Determination of 17 α -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake. **Environmental Monitoring and Assessment**, [S. l.], v. 192, n. 1, 2020. DOI: 10.1007/s10661-019-7990-2.

FROEHNER, Sandro; PICCIONI, Willian; MACHADO, Karina Scurupa; AISSE, Miguel Mansur. Removal Capacity of Caffeine, Hormones, and Bisphenol by Aerobic and Anaerobic Sewage Treatment. **Water, Air e Soil Pollution**, v. 216, p. 463-471, 2011.
DOI: 10.1007/s11270-010-0545-3.

GAVRILESCU, Maria; DEMNEROVÁ, Kateřina; AAMAND, Jens; AGATHOS, Spiros; FAVA, Fabio. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 147-156, 2015. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.01.001.

GHISELLI, Gislaine. **Avaliação 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. Tese (Doutorado em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.

GOEPPERT, Nadine; DROR, Ishai; BERKOWITZ, Brian. Fate and transport of free and conjugated estrogens during soil passage. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 206, p. 80-87, 2015. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.06.024.

GOMES, Giselle. **Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Centro de Tecnologia e Ciências - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

GOMES, Giselle. **Avaliação dos fatores de interferência no ensaio in vitro Yeast Estrogen Screen (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas**. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

GORE, A. C.; CHAPPELL, V. A.; FENTON, S. E.; FLAWS, J. A.; NADAL, A.; PRINS, G. S.; TOPPARI, J.; ZOELLER, R. T. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's second Scientific Statement on endocrine-disrupting chemicals. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 593-602, 2015. DOI: 10.1210/er.2015-1093.

GORE, Andrea C.; CREWS, David; DOAN, Loretta L.; MERRILL, Michele La; PATISAUL, Heather; ZOTA, Ami. **Introdução aos disruptores endócrinos (DEs): Um guia para governos e organizações de interesse público.** [S. l.], p. 76, 2014.

GORGA, Marina; INSA, Sara; PETROVIC, Mira; BARCELÓ, Damià. Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1352, p. 29-37, 2014. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.028.

GUILLETTE, Louis J.; PICKFORD, Daniel B.; CRAIN, D. Andrew; ROONEY, Andrew A.; PERCIVAL, H. Franklin. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 32-42, 1996. DOI: 10.1006/gcen.1996.0005.

GUO, Wei; LU, Shaoyong; SHI, Jianghong; ZHAO, Xu. Ecotoxicology and Environmental Safety Effect of corn straw biochar application to sediments on the adsorption of 17 α -ethinyl estradiol and per fl uorooctane sulfonate at sediment-water interface. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 174, p. 363–369, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.128.

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. DOI: 10.1016/j.watres.2012.08.002.

HAMILTON, Katherine J.; HEWITT, Sylvia C.; ARAO, Yukitomo; KORACH, Kenneth S. Estrogen Hormone Biology. **Current Topics in Developmental Biology**. 1^a ed, [S.l.], v. 125, c. 4, 2017. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.12.005.

HEALY, M. G.; FENTON, O.; CORMICAN, M.; PEYTON, D. P.; ORDSMITH, N.; KIMBER, K.; MORRISON, L. Antimicrobial compounds (triclosan and triclocarban) in sewage sludges, and their presence in runoff following land application. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 142, n. January, p. 448-453, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.04.046.

HERBST, A. L.; ULFELDER, H.; POSKANZER, D. C. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **New England Journal of Medicine**, v. 284, n.15, p. 878-881, 1971.

HETTWER, Karina *et al.* Validation of Arxula Yeast Estrogen Screen assay for detection of estrogenic activity in water samples: Results of an international interlaboratory study. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 621, p. 612-625, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.211.

HO, V.; PELLAND-ST-PIERRE, L.; GRAVEL, S.; BOUCHARD, M. F.; VERNER, M. A.; LABRÈCHE, F. Endocrine disruptors: Challenges and future directions in epidemiologic research. **Environmental Research**, [S. l.], v. 204, 2022. DOI: 10.1016/j.envres.2021.111969.

HOM, Marianne; SRIPRASERT, Intira; IHENACHO, Ugonna; ESTEBAN CASTELAO, J.; SIEGMUND, Kimberly; BERNSTEIN, Leslie; CORTESSIS, Victoria K. Systematic Review and Meta-analysis of Testicular Germ Cell Tumors following in Utero Exposure to Diethylstilbestrol. **JNCI Cancer Spectrum**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 1-7, 2019. DOI: 10.1093/jncics/pkz045.

HUANG, F., KARU, K. e CAMPOS, L. C. Simultaneous measurement of free and conjugated estrogens in surface water using capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analyst**, [S. l.], v. 146, n. 8, p. 2689-2704, 2021. DOI:10.1039/D0AN02335C.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/juiz-de-fora>>. Acesso em 24 de maio de 2023.

INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). Disponível em <<https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>>. Acesso em 25 de junho de 2023.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA). Orientação sobre validação de métodos analíticos. 8ª ed. [S.l.]:Coordenação Geral de Acreditação, 2020. DOQ-CGCRE-008. 20 p.

ISTVAN, M.; RAHBAN, R.; DANANCHE, B.; SENN, A.; STETTLER, E.; MULTIGNER, L.; NEF, S.; GARLANTÉZEC, R. Maternal occupational exposure to endocrine-disrupting chemicals during pregnancy and semen parameters in adulthood: results of a nationwide cross-sectional study among Swiss conscripts. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 1948-1958, 2021. DOI: 10.1093/humrep/deab034.

JAGNE, J.; WHITE, D.; JEFFERSON, F. Endocrine-disrupting chemicals: adverse effects of bisphenol A and parabens to women's health. **Water Air Soil Pollut**, [S. l.], v. 227, n.6, p. 182, 2016. DOI: 10.1007/s11270-016-2785-3.

JIN, S.; YANG, F.; LIAO, T. et al. Enhanced effects by mixtures of three estrogenic compounds at environmentally relevant levels on development of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 277-283, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.016>

JOHANSSON, H. K. L.; SVINGEN, T.; FOWLER, P.A.; VINGGAARD, A.M.; BOBERG, J. Environmental influences on ovarian dysgenesis - developmental windows sensitive to chemical exposures. **Nature Reviews Endocrinology**, v.13, n. 7, p. 400-414, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.36>.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 8ª ed. Rio de Janeiro: ABES, 2017.

KAMATA, Ryo; SHIRAIISHI, Fujio; NAKAMURA, Kazuichi. Avian eggshell thinning caused by transovarian exposure to o,p'-DDT: Changes in histology and calcium-binding protein production in the oviduct uterus. **Journal of Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 131-136, 2020. DOI: 10.2131/jts.45.131.

KASONGA, Teddy Kabeya; COETZEE, Martie A. A.; KAMIKA, Ilunga; NGOLE-JEME, Veronica M.; BENTEKE MOMBA, Maggy Ndombo. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 277, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111485.

KING, Olivia C.; VAN DE MERWE, Jason P.; MCDONALD, James A.; LEUSCH, Frederic L. D. Concentrations of levonorgestrel and ethinylestradiol in wastewater effluents: is the progestin also cause for concern? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1378-1385, 2016. <https://doi.org/10.1002/etc.3304>.

KIOUMOURTZOGLU, Marianthi Anna; COULL, Brent A.; O'REILLY, Éilis J.; ASCHERIO, Alberto; WEISSKOPF, Marc G. Association of exposure to diethylstilbestrol during pregnancy with multigenerational neurodevelopmental deficits. **JAMA Pediatrics**, [S. l.], v. 172, n. 7, p. 670-677, 2018. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2018.0727.

KIYAMA, Ryoiti; WADA-KIYAMA, Yuko. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. **Environment International**, [S. l.], v. 83, p. 11-40, 2015. DOI: 10.1016/j.envint.2015.05.012.

KLANČIČ, Veronika; GOBEC, Martina; JAKOPIN, Žiga. Halogenated ingredients of household and personal care products as emerging endocrine disruptors. **Chemosphere**, [S. l.], v. 303, 2022. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134824.

KOLLE, S. N.; KAMP, H. G.; HUENER, H. A.; KNICKEL, J.; VERLOHNER, A.; WOITKOWIAK, C.; LANDSIEDEL, R.; VAN RAVENZWAAY, B. In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 2030-2040, 2010. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.08.008.

KOMOLAFE, Oladapo; MROZIK, Wojciech; DOLFING, Jan; ACHARYA, Kishor; VASSALLE, Lucas; MOTA, Cesar R.; DAVENPORT, Russell. Occurrence and removal of micropollutants in full-scale aerobic, anaerobic and facultative wastewater treatment plants in Brazil. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 287, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112286.

KONEMANN, Sarah.; KASE, Robert.; SIMON, Eszter.; SWART, Kees.; BUCHINGER, Sebastian; SCHLUSENER, Michael.; HOLLERT, Henner.; ESCHER, Beate. I.; WERNER, Inge; AIT-AISSA, Selim; VERMEIRSEN, Etienne; DULIO, Valeria; VALSECCHI, Sara; POLESSELLO, Stefano; BEHNISCH, Peter; JAVURKOVA, Barbora; PERCEVAL, Olivier; DI PAOLO, Carolina; OLBRICH, Daniel; SYCHROVA, Eliska.; SCHLICHTING, Rita; LEBORGNE, Lomig; CLARA, Manfred; SCHEFFKNECHT, Christoph; MARNEFFE, Yves; CHALON, Carole; TUSIL, Petr.; SOLDÁN, Přemysl; VON DANWITZ, Brigitte; Schwaiger, Julia; BECARES, Maria Isabel San Martín; BERSANI, Francesca; HILSCHEROVÁ, Klara; REIFFERSCHIED, George; TERNES, Thomas; CARERE, Mario, 2018. Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 102, p. 225-235, 2018. DOI: 10.1016/j.trac.2018.02.008.

KUMAR, Ravinder; VUPPALADADIYAM, Arun K.; ANTUNES, Elsa; WHELAN, Anna; FEARON, Rob; SHEEHAN, Madoc; REEVES, Louise. Emerging contaminants in biosolids: Presence, fate and analytical techniques. **Emerging Contaminants**, [S. l.], v. 8, p. 162-194, 2022. DOI: 10.1016/j.emcon.2022.03.004.

KUNZ, P. Y. et al. Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. **Water Research**, [S. l.], v. 110, p. 378-388, 2017. DOI: 10.1016/j.watres.2016.10.062.

LAINING, L. V. et al. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). **Epigenetics**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 526-538, 2016. DOI: 10.1080/15592294.2016.1182272.

LAMBERT, Max R.; GILLER, Geoffrey S. J.; BARBER, Larry B.; FITZGERALD, Kevin C.; SKELLY, David K. Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 112, n. 38, p. 11881–11886, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1501065112.

LARCHER, Simone; DELBÈS, Geraldine; ROBAIRE, Bernard; YARGEAU, Viviane. Degradation of 17 α -ethinylestradiol by ozonation - Identification of the by-products and assessment of their estrogenicity and toxicity. **Environment International**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 66-72, 2012. DOI: 10.1016/j.envint.2011.09.008.

LATHI, Ruth B.; LIEBERT, Cara A.; BROOKFIELD, Kathleen F.; TAYLOR, Julia A.; VOM SAAL, Frederick S.; FUJIMOTO, Victor Y.; BAKER, Valerie L. Conjugated bisphenol A in maternal serum in relation to miscarriage risk. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 123–128, 2014. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.024.

LEE, Hae Kyung et al. Evaluation of in vitro screening system for estrogenicity: Comparison of stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation (OECD TG455) assay and estrogen receptor (ER) binding assay. **Journal of Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 431-437, 2012. DOI: 10.2131/jts.37.431.

LEE, Duk Hee; JACOBS, David R. Firm human evidence on harms of endocrine-disrupting chemicals was unlikely to be obtainable for methodological reasons. **Journal of Clinical Epidemiology**, [S. l.], v. 107, p. 107-115, 2019. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2018.12.005.

LEE, Hye Rim; JEUNG, Eui Bae; CHO, Myung Haing; KIM, Tae Hee; LEUNG, Peter C. K.; CHOI, Kyung Chul. Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1-11, 2013. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01649.x.

LEUSCH, Frederic D. L. et al. Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries. **Water Research**, [S. l.], v. 139, p. 10-18, 2018. DOI: 10.1016/j.watres.2018.03.056.

LIMA, Rafael Monteiro de. **Avaliação da eficiência de estações de tratamento de esgoto (ETE) operadas pela Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CESB): Estudo de caso da ETE Sobradinho**. 2021. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental), Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2021.

LIU, Jingjing; WU, Qunhong; HAO, Yanhua; JIAO, Mingli; WANG, Xing; JIANG, Shengchao; HAN, Liyuan. Measuring the global disease burden of polycystic ovary syndrome in 194 countries: Global Burden of Disease Study 2017. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 1108-1119, 2021. DOI: 10.1093/humrep/deaa371.

LIU, Z.; LU, G.; YIN, H.; DANG, Z.; RITTMANN, B.. Removal of natural estrogens and their conjugates in municipal wastewater treatment plants: a critical review. **Environmental Science Technology**. n. 49, p. 5288-5300, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00399>.

LIU, Jianchao; ZHANG, Lingyu; LU, Guanghua; JIANG, Runren; YAN, Zhenhua; LI, Yiping. Occurrence, toxicity and ecological risk of Bisphenol A analogues in aquatic environment – A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 208, p. 111481, 2021. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111481.

LOPES, Laudicéia G.; MARCHI, Mary R. R.; SOUZA, João B. G.; MOURA, José A.; LORENZON, Cintia S.; CRUZ, Claudinei; AMARAL, Luiz A. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de jaboticabal - São Paulo. **Química Nova**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000300029.

LOPES, Vania Rodrigues. **Avaliação da atividade estrogênica em esgotos sanitários e águas de reúso na região metropolitana de São Paulo Avaliação da atividade estrogênica em esgotos sanitários e águas de reúso na região metropolitana de São Paulo**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LUO, Yunlong; GUO, Wenshan; NGO, Huu Hao; NGHIEM, Long Duc; HAI, Faisal Ibney; ZHANG, Jian; LIANG, Shuang; WANG, Xiaochang C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 473-474, p. 619-641, 2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065.

MA, Li; YATES, Scott R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 640–641, p. 529-542, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.301.

MAGALHÃES, Déborah Neide de. **Toxicidade No Cotratamento De Esgoto Sanitário E Lixiviado De Aterro Sanitário**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2012.

MARGOT, Jonas et al. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 461-462, p. 480-498, 2013. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.05.034.

MARTINI, G. A.; MONTAGNER, C. C.; VIVEIROS, W., QUINAGLIA, G. A.; DAYRELL, D. F.; MUNIN, N. C. G.; LOPES-FERREIRA, M.; ROGERO, S. O.; ROGERO, J. R. Emerging contaminant occurrence and toxic effects on zebrafish embryos to assess the adverse effects caused by mixtures of substances in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 20313-20329, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11963-x>/Published.

MARTINS JÚNIOR, Antônio Carlos de Oliveira; SILVA, Maria Cristina de Almeida; BENETTI, Antônio Domingues. Tratamento e avaliação estatística de variáveis de controle do processo de lodos ativados: estudo de caso com dados de monitoramento padrão de estação de tratamento de efluentes de grande porte. *In: Congresso da Associação Brasileira de Engenharia Ambiental e Sanitária – ABES, XXXI, 2021, Curitiba – PR. Anais [...], [S. l.], 2021.*

MATUSZCZAK, Ewa; KOMAROWSKA, Marta Diana; DEBEK, Wojciech; HERMANOWICZ, Adam. The Impact of Bisphenol A on Fertility, Reproductive System, and Development: A Review of the Literature. **International Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 2019, p. 6-8, 2019. DOI: 10.1155/2019/4068717.

MCLACHLAN, J. A. Prenatal exposure to diethylstilbestrol in mice - Toxicological Studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 2, n. 3, p. 527-537, 1977. DOI: 10.1080/15287397709529453.

METCALF, Leonard; EDDY, Harrison. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5ª ed. Editora AMGH, Porto Alegre-RS, 2016. 1980p.

METCALFE, C. D.; BAYEN, S.; DESROSIERS, M.; MUÑOZ, G.; SAUVÉ, S.; YARGEAU, V. An introduction to the sources, fate, occurrence and effects of endocrine disrupting chemicals released into the environment. **Environmental Research**, [S. l.], v. 207, 2022. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112658.

MIGLIACCIO, Vincenzo; SCUDIERO, Rosaria; SICA, Raffaella; LIONETTI, Lilla; PUTTI, Rosalba. Oxidative stress and mitochondrial uncoupling protein 2 expression in hepatic steatosis induced by exposure to xenobiotic DDE and high fat diet in male Wistar rats. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 1-24, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0215955.

MONTAGNER, C. C. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), Brasil, 2007.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

NELSON, Jasen; BISHAY, Farida; VAN ROODSELAAR, Albert; IKONOMOU, Michael; LAW, Francis C. P. The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 374, n. 1, p. 80-90, 2007. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.11.031.

NGUYEN, P. Y.; CARVALHO, Gilda; REIS, Maria A. M.; OEHMEN, Adrian. A review of the biotransformations of priority pharmaceuticals in biological wastewater treatment processes. **Water Research**, [S. l.], v. 188, p. 116446, 2021. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116446.

NOCKO, Lissa Maria. **Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido à aeração intermitente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2008.

WHO (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). **Guidelines for Drinking-water Quality**. 4. ed. Geneva, Switzerland, 2017.

WHO (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). **Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health**, 2012.

WHO (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). **State of the science of endocrine disrupting chemicals**, 2012.

Origin(Pro), OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

PADILHA, Camila Fernanda; LEITZKE, Filipe Leonardo dos Santos Leitzke. **Determinação de Hormônios Sexuais Feminios na Bacia do Alto Rio Iguaçu na Região de Curitiba-PR**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química), Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Curitiba - PR, 2013.

PAL, Parimal. Treatment and disposal of pharmaceutical wastewater: toward the sustainable strategy. **Separation e Purification Reviews**, [S. l.], v.47, n. 3, p. 179-198, 2018. DOI: 10.1080/15422119.2017.1354888.

PANNEKENS, Helena; GOTTSCHLICH, Anne; HOLLERT, Henner; DOPP, Elke. Evaluation of mixture effects of endocrine active substances in wastewater using CALUX reporter-gene assays. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [S. l.], v. 222, n. 4, p. 670-677, 2019. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.04.008.

PAPA, Matteo; DOGRUER, Gulsah; BAILEY, David; LEUSCH, Frederic D. L. Anaerobic digestion of sewage sludge has no effect on glucocorticoid and anti-progestagenic activity but increases estrogenicity three-fold. **Chemosphere**, [S. l.], v. 286, n. P2, 2022. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131753.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T. A.; BONERZ, M.; RASTALL, A. C.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 129-138, 2004. DOI: 10.1016/j.tiv.2003.08.006.

PESSOA, G. P.; SOUZA, N. C.; ALVES, J. A. C.; NASCIMENTO, R. F.; SANTOS, A. B. (2011) Análise de remoção de interferentes endócrinos em estações de tratamento de esgotos sanitários. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, XXVI. *Anais [...]* Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2011.

PESSOA, Germana de Paiva; SANTOS, André Bezerra Dos; SOUZA, Neyliane Costa De; ALVES, Joana Angélica Correia; NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos.

Química Nova, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012.

DOI: 10.1590/s0100-40422012000500019.

PESSOA, Germana P.; DE SOUZA, Neyliane C.; VIDAL, Carla B.; ALVES, Joana A. C.; FIRMINO, Paulo Igor M.; NASCIMENTO, Ronaldo F.; DOS SANTOS, André B.

Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 490, p. 288-295, 2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.008.

PETEFFI, G. P.; FLECK, J. D.; KAEI, I. M.; ROSA, D. C.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River Basin - Rio Grande do Sul - Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 712-721, 2019. DOI: 10.1590/1519-6984.189752.

PETOSA, Adamo Ricardo; NOWIERSKI, Monica; YARGEAU, Viviane. Assessing Performance of Wastewater Treatment Using in Vitro Cell-based Assays. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 1, p. 21-36, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s00244-021-00900-9>

PILLON, Delphine; CADIOU, Virginie; ANGULO, Leslie; DUITTOZ, Anne Hélène. Maternal exposure to 17-alpha-ethinylestradiol alters embryonic development of GnRH-1 neurons in mouse. **Brain Research**, [S. l.], v. 1433, p. 29-37, 2012.

DOI: 10.1016/j.brainres.2011.11.030.

PORTER, Karen L.; OLMSTEAD, Allen W.; KUMSHER, David M.; DENNIS, William E.; SPRANDO, Robert L.; HOLCOMBE, Gary W.; KORTE, Joseph J.; LINDBERG-LIVINGSTON, Annelie; DEGITZ, Sigmund J. Effects of 4-tert-octylphenol on *Xenopus tropicalis* in a long term exposure. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 103, n. 3-4, p. 159-169, 2011. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.02.019.

QUEIROZ, F. B. et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. **Water Science and Technology**, v. 66, p. 2562-2569, 2012. DOI: 10.2166/wst.2012.482.

QUEIROZ, Fernanda Barbosa de. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2011. Universidade Federal de Ouro Preto, Dissertação (Mestrado), Ouro Preto, 2011.

RAJASULOCHANA, P. Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water – A comprehensive review. **Resource Efficient Technologies**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 175-184, 2016. DOI: 10.1016/j.reffit.2016.09.004.

RATHI, B. Senthil; KUMAR, P. Senthil; SHOW, Pau-loke. Journal of **Hazardous Materials**, [S. l.], p. 124413, 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124413.

RODIER, Jean. **Análise de Águas**. 9ª ed. São Paulo: Ômega, 2009.

RODRIGUES, Keila Letícia Teixeira; SANSON, Ananda Lima; QUARESMA, Amanda de Vasconcelos; GOMES, Rafaela de Paiva; DA SILVA, Gilmar Antônia; AFONSO, Robson José de Cássia Franco. Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 117, p. 242–249, 2014. DOI: 10.1016/j.microc.2014.06.017.

ROUTLEDGE, Edwin J.; SUMPTER, John P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996. DOI: 10.1897/1551-5028.

RUBIN, Beverly S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 127, n. 1-2, p. 27-34, 2011. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.05.002.

RUNNALLS, T. J.; BERESFORD, N.; LOSTY, E.; SCOTT, A.P.; SUMPTER, J.P., Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environmental Science Technology*, v. 47, 2013, p. 2077-2084. <https://doi.org/10.1021/es3048834>

SANSON, Ananda Lima. **Estudo da Extração e Desenvolvimento de Metodologia para Determinação Simultânea de Microcontaminantes Orgânicos em Água Superficial por GC-MS e Métodos Quimiométricos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG, 2012.

SCHWENDIMAN, Angela L.; PROPPER, Catherine R. A common environmental contaminant affects sexual behavior in the clawed frog, *Xenopus tropicalis*. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 106, n. 4, p. 520-526, 2012. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.03.035.

SHULIAKEVICH, A.; SCHROEDER, K.; NAGENGAST, L.; WOLF, Y.; BRÜCKNER, I.; MUZ, M.; BEHNISCH, P.A.; HOLLERT, H.; SCHIWY, S. Extensive rain events have a more substantial impact than advanced effluent treatment on the endocrine-disrupting activity in an effluent-dominated small river. **Science of the Total Environment**, v. 807, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150887>.

SODRÉ, Fernando F.; LOCATELLI, Marco Antonio F.; JARDIM, Wilson F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, [S. l.], v. 206, n. 1-4, p. 57-67, 2010. DOI: 10.1007/s11270-009-0086-9.

SOLANO, Marize; MONTAGNER, Cassiana C.; VACCARI, Carolina; JARDIM, Wilson F.; ANSELMO-FRANCI, Janete A.; DE OG CAROLINO, Ruither; LUVIZUTTO, João Fl; DE A UMBUZEIRO, Gisela; DE CAMARGO, João Lv. Potential endocrine disruptor activity of drinking water samples. **Endocrine Disruptors**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. e983384, 2015. DOI: 10.4161/23273747.2014.983384.

SONG, Jingyang et al. Integrated estrogenic effects and semi-volatile organic pollutants profile in secondary and tertiary wastewater treatment effluents in North China. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 435, n. December 2021, p. 128984, 2022. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128984.

SONG, S.; RUAN, T.; WANG, T.; LIU, R.; JIANG, G. Distribution and preliminary exposure assessment of bisphenol AF (BPAF) in various environmental matrices around a manufacturing plant in China. **Environmental Science e Technology**, [S. l.], v. 46, n. 24, p. 13136-13143, 2012. <https://doi.org/10.1021/es303960k>.

SOUSA, Diana. Nara Ribeiro de.; MOZETO, Antonio Aparecido.; CARNEIRO, Renato Lajarim.; FADINI, Pedro Sergio. Spatio-temporal evaluation of emerging contaminants and their partitioning along a Brazilian watershed. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 5, p. 4607-4620, 2018. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-0767-7>

SOUZA, Neyliane Costa de. 2011. **Avaliação de Micropoluentes Emergentes em Esgotos e Águas Superficiais**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 2011.

SPOSITO, Juliana C. V.; MONTAGNER, Cassiana C.; CASADO, Marta; NAVARRO-MARTÍN, Laia; JUT SOLÓRZANO, Julio César; PIÑA, Benjamin; GRISOLIA, Alexeia B. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, [S. l.], v. 209, p. 696-704, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.046.

STATSOFT. **Statistica (data analysis software system)**, version 8.0. 2007.

STOKER, Cora; BELDOMÉNICO, Pablo M.; BOSQUIAZZO, Verónica L.; ZAYAS, Marcelo A.; REY, Florencia; RODRÍGUEZ, Horacio; MUÑOZ-DE-TORO, Mónica; LUQUE, Enrique H. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in Caiman latirostris. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 156, n. 3, p. 603-612, 2008. DOI: 10.1016/j.ygcen.2008.02.011.

SWAN, Shannah .H., COLINO, S., 2021. **Count Down: How Our Modern World Is Threatening Sperm Counts, Altering Male and Female Reproductive Development, and Imperiling the Future of the Human Race**. Ed. Simon e Schuster: Nova York – EUA, 304 p., 2022. ISBN: 1982113677.

TAMSCHICK, Stephanie et al. Impaired gonadal and somatic development corroborate vulnerability differences to the synthetic estrogen ethinylestradiol among deeply diverged anuran lineages. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 177, p. 503–514, 2016. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.07.001.

TEIXEIRA, Rossana Borges. **Estudo da presença e remoção de hormônios estrogênicos em estação de tratamento de esgoto por lodos ativados**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

TEIXEIRA, Luiza C. G. M.; DAS CHAVES, Juliane Ribeiro; MENDONÇA, Neyson; SANSON, Ananda L.; ALVES, Mariana C. P.; AFONSO, Robson J. C. F.; AQUINO, Sérgio F. Occurrence and removal of drugs and endocrine disruptors in the Bolonha Water Treatment Plant in Belém/PA (Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, [S. l.], v. 193, n. 5, p. 1-18, 2021. DOI: 10.1007/s10661-021-09025-x.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 225, n. 1-2, p. 81-90, 1999. DOI: 10.1016/S0048-9697(98)00334-9.

TESKE, Sondra S.; ARNOLD, Robert G. Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 107-124, 2008. DOI: 10.1007/s11157-008-9129-8.

TROISI, J.; MIKELSON, C.; RICHARDS, S.; SYMES, S.; ADAIR, D.; ZULLO, F.; GUIDA, M. Placental concentrations of bisphenol A and birth weight from births in the Southeastern U.S. **Placenta**, [S. l.], v. 35, n. 11, p. 947-952, 2014. DOI: 10.1016/j.placenta.2014.08.091.

TUKEY, J. W. **Exploratory Data Analysis**. Massachusetts: Addison-Wesley, 1977.

UMULISA, Viviane; KALISA, Daniel; SKUTLAREK, Dirk; REICHERT, Barbara. First evaluation of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) residues and other Persistence Organic Pollutants in soils of Rwanda: Nyabarongo urban versus rural wetlands. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 197, p. 110574, 2020. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110574.

USAL, Marie et al. Transgenerational metabolic disorders and reproduction defects induced by benzo[a]pyrene in *Xenopus tropicalis*. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 269, 2021. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.116109.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Contaminant Information Sheets for the Final CCL 5 Chemicals**, Washington D. C., 2022.

VANDENBERG, Laura N.; BLUMBERG, Bruce; ANTONIOU, Michael N.; BENBROOK, Charles M.; CARROLL, Lynn; COLBORN, Theo; EVERETT, Lorne G.; HANSEN, Michael; LANDRIGAN, Philip J.; LANPHEAR, Bruce P.; MESNAGE, Robin; VOM SAAL, Frederick S.; WELSHONS Wade V.; MYERS, John Peterson. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? **Journal of Epidemiology and Community Health**, [S. l.], v. 71, n. 6, p. 613-618, 2017. DOI: 10.1136/jech-2016-208463.

VANDER BORGHT, Mélodie; WYNS, Christine. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 62, n. March, p. 2–10, 2018. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.

VARTICOVSKI, L.; STAVREVA, D. A.; MCGOWAN, A.; RAZIUDDIN, R.; HAGER, G. L. Endocrine disruptors of sex hormone activities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 539, 2022. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111415.

VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Evaluation of the presence of endocrine-disrupting compounds in dissolved and solid wastewater treatment plant samples of Gran Canaria Island (Spain). **BioMed Research International**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1155/2013/790570.

VERDERAME, Mariailaria; PRISCO, Marina; ANDREUC CETTI, Piero; ANIELLO, Francesco; LIMATOLA, Ermelinda. Experimentally nonylphenol-polluted diet induces the expression of silent genes VTG and ER α in the liver of male lizard *Podarcis sicula*. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 159, n. 5, p. 1101-1107, 2011. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.02.017.

VON SPERLING, Marcos; VERBYLA, Matthew E.; OLIVEIRA, Sílvia M. A. C. Assessment of Treatment Plant Performance and Water Quality Data: A Guide for Students, Researchers and Practitioners. Londres: IWA Publishing, 2020.

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

VON SPERLING, Marcos. **Lagoas de estabilização**. 2ª ed. Belo Horizonte: UFMG, 2017. 196 p.

VON SPERLING, Marcos. **Lodos ativados**. 4ª ed. Belo Horizonte: UFMG, 2016. 461 p.

VON SPERLING, Marcos. **Reatores anaeróbios**. 2ª ed. Belo Horizonte: UFMG, 2016. 379 p.

WANG, Jun; ELDRIDGE, Melanie; MENN, Fu min; DYKES, Todd; SAYLER, Gary. Standardized application of yeast bioluminescent reporters as endocrine disruptor screen for comparative analysis of wastewater effluents from membrane bioreactor and traditional activated sludge. **Ecotoxicology**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 2088-2099, 2015. DOI: 10.1007/s10646-015-1556-z.

WANG, Wei; HAFNER, Katlyn S.; FLAWS, Jodi A. In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 276, n. 2, p. 157-164, 2014. DOI: 10.1016/j.taap.2014.02.009.

WAUTIER, Anne; TOURNAIRE, Michel; DEVOUCHE, Emmanuel; EPELBOIN, Sylvie; POULY, Jean Luc; LEVADOU, Anne. Genital tract and reproductive characteristics in daughters of women and men prenatally exposed to diethylstilbestrol (DES). **Thérapie**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.therap.2019.10.004.

WEBER, André Alberto; MOREIRA, Davidson Peruci; MELO, Rafael Magno Costa; VIEIRA, Augusto Bicalho Cruz; PRADO, Paula Suzanna; DA SILVA, Mirra Angelina Neres; BAZZOLI, Nilo; RIZZO, Elizete. Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 592, p. 693-703, 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.181.

WEN, Zhidan; HUANG, Xiaoli; GAO, Dawen; LIU, Gao; FANG, C.; SHANG, Y.; DU, Jia; ZHAO, Ying; LV, Lili.; SONG, Kaishan. Phthalate esters in surface water of Songhua River watershed associated with land use types, Northeast China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 8, p. 7688-7698, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1119-3>.

WERLE, Sebastian; SOBEK, Szymon. Gasification of sewage sludge within a circular economy perspective: a Polish case study. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 26, n. 35, p. 35422–35432, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-05897-2.

WHYATT, Robin M. et al. Prenatal di(2-ethylhexyl)phthalate exposure and length of gestation among an inner-city cohort. **Pediatrics**, [S. l.], v. 124, n. 6, 2009. DOI: 10.1542/peds.2009-0325.

YANG, Zhibing; SHI, Junxia; GUO, Zhizhun; CHEN, Mingyue; WANG, Chonggang; HE, Chengyong; ZUO, Zhenghong. A pilot study on polycystic ovarian syndrome caused by neonatal exposure to tributyltin and bisphenol A in rats. **Chemosphere**, [S. l.], v. 231, p. 151-160, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.129.

YOST, E.E.; MEYER, M.T.; DIETZE, J.E.; WILLIAMS, C.M.; WORLEY-DAVIS, L.; LEE, B.; KULLMAN, S.W. Transport of steroid hormones, phytoestrogens, and estrogenic activity across a swine lagoon/sprayfield system. **Environmental Science e Technology**. v. 48, n. 19, p. 11600-11609, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.025>.

ZHANG, Jianyun; YANG, Ye; LIU, Weiping; SCHLENK, Daniel; LIU, Jing. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and corticosteroid homeostasis are potential targets for endocrine-disrupting chemicals. **Environment International**, [S. l.], v. 133, 2019. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105133.

ZHAO, Jianwei; XIN, Mingxue; ZHANG, Jing; SUN, Yingjie; LUO, Siyi; WANG, Huawei. Diclofenac inhibited the biological phosphorus removal: Performance and mechanism. **ECSN**, [S. l.], v. 243, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125380.

APÊNDICE A – Estatística descritiva da caracterização físico-química das amostras de efluente bruto e tratado.

Parâmetros estatísticos / Parâmetros físico-químicos	Tipo de efluente	N	Med	M	Mín	Máx	DP	CV (%)
pH	Bruto	10	7,44	7,47	7,32	7,8	0,02	1,97
	Tratado	8	7,5	7,5	7,27	7,77	0,02	2,02
Condutividade ($\mu\text{s.cm}^{-1}$)	Bruto	10	800	790	505	1026	141	17,81
	Tratado	7	716	711	665	747	30	4,25
SST (mg.L^{-1})	Bruto	17	195	193	69	299	64	33,01
	Tratado	15	39	55	3	143	44	80,75
DQO total (mg.L^{-1})	Bruto	17	362	401	165	625	106	26,34
	Tratado	13	50	54	27	81	17	32,37
DQO filtrada (mg.L^{-1})	Bruto	18	161	166	76	271	64	38,7
	Tratado	14	35	35	13	65	16	45,01
DQO particulada (mg.L^{-1})	Bruto	16	196	215	86	357	75	35,06
	Tratado	7	13	15	2	30	9	63,50
N-NH ₃ (mg.L^{-1})	Bruto	18	48,1	43,6	21,9	57	11,8	27,16
	Tratado	14	25	23,2	6	48,2	12,5	53,9
NTK (mg.L^{-1})	Bruto	19	57	56,6	36,2	74,3	11,2	19,74
	Tratado	15	28,2	27,1	12,7	39,9	8,3	30,74
Norg (mg.L^{-1})	Bruto	18	9,1	13,4	<LD	29,8	9,3	69,28
	Tratado	7	3,4	3,9	0,6	8,2	2,4	61,89
NO ₃ ⁻ (mg.L^{-1})	Bruto	11	0,14	0,12	0,05	0,19	0,05	41,34
	Tratado	8	0,16	0,17	0,12	0,26	<LD	26,12

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: N (número de dados); mediana (Med); média (M), mínimo (Mín); máximo (Máx); desvio padrão (DP), variância (V); coeficiente de variação (CV); demanda química de oxigênio (DQO); sólidos suspensos totais (SST); nitrogênio amoniacal (N-NH₃); nitrogênio total *kjeldahl* (NTK); nitrato (NO₃⁻); nitrogênio orgânico (Norg).

APÊNDICE B – Teste de normalidade e de desvio dos parâmetros físico-químicos do efluente bruto nos períodos de chuva e de estiagem.

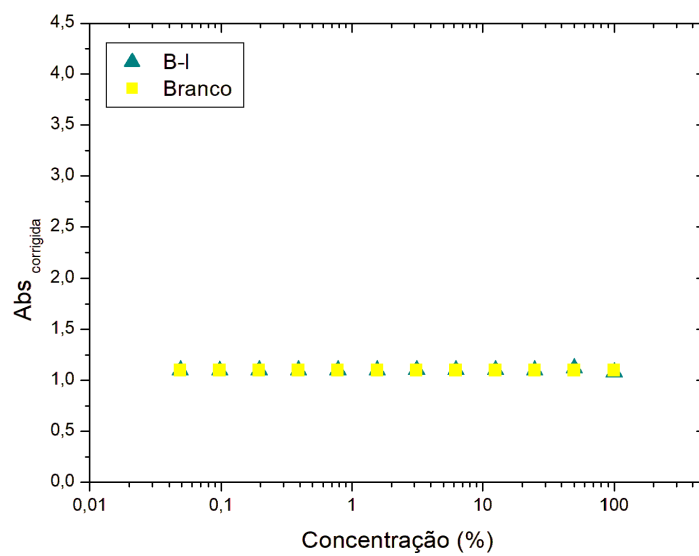
Parâmetros	Amostra	Número de amostras	Teste de normalidade	p-valor	Teste de desvio	p-valor
pH	Estiagem	6	Shapiro-Wilk	0,52	T-Student	0,6275
	Chuva	4		0,89		
Condutividade	Estiagem	6	Shapiro-Wilk	0,77	T-Student	0,6813
	Chuva	4		0,56		
Sólidos suspensos totais (SST)	Estiagem	10	Shapiro-Wilk	0,08	T-Student	0,8859
	Chuva	7		0,22		
Demanda química de oxigênio (DQO) total	Estiagem	10	Shapiro-Wilk	0,67	T-Student	0,0393
	Chuva	5		0,99		
Demanda química de oxigênio (DQO) filtrada	Estiagem	10	Shapiro-Wilk	0,15	T-Student	0,0609
	Chuva	8		0,24		
Demanda química de oxigênio (DQO) particulada	Bruto	9	Shapiro-Wilk	0,85	T-Student	0,1933
	Tratado	4				
Nitrogênio total <i>kjeldahl</i> (NTK)	Estiagem	11	Shapiro-Wilk	0,98	T-Student	0,4623
	Chuva	8		0,71		
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₃)	Estiagem	10	Shapiro-Wilk	0,03	Mann-Whitney	0,0004
	Chuva	8		0,15		
Nitrogênio orgânico	Estiagem	10	Shapiro-Wilk	0,18	T-Student	0,9363
	Chuva	8		0,46		
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Estiagem	6	Shapiro-Wilk	0,83	Mann-Whitney	0,0899
	Chuva	5		0,03		

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE C – Teste de normalidade e de desvio dos parâmetros físico-químicos do efluente bruto e do efluente tratado.

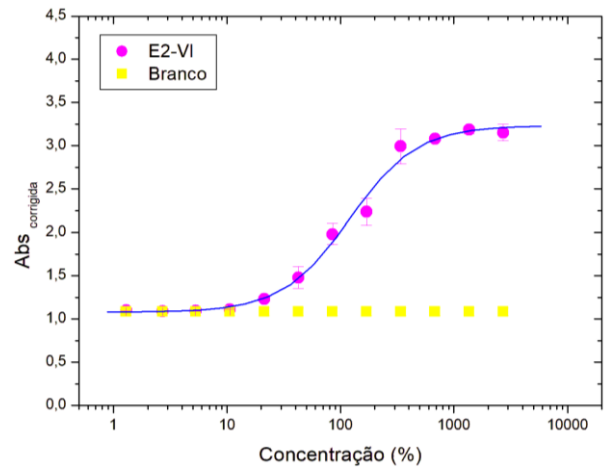
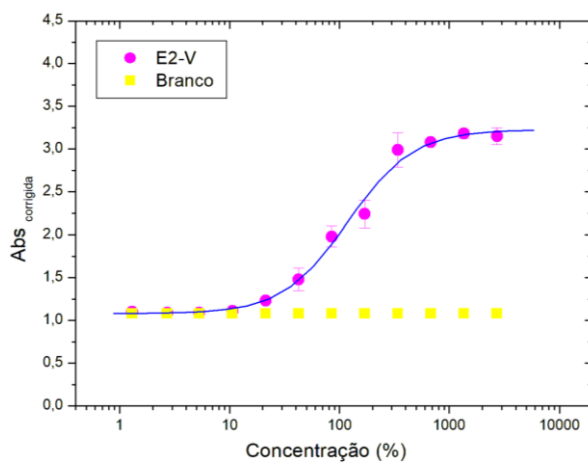
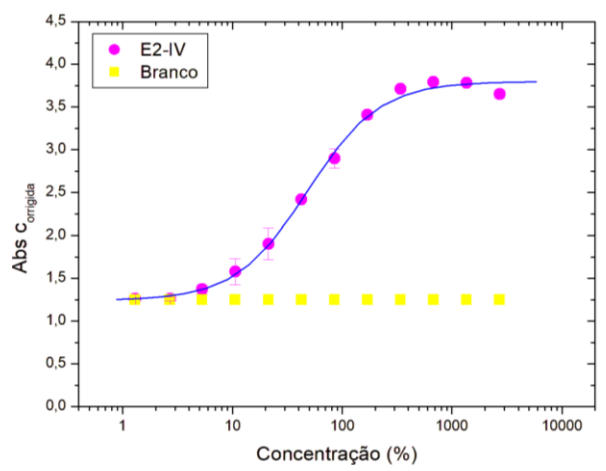
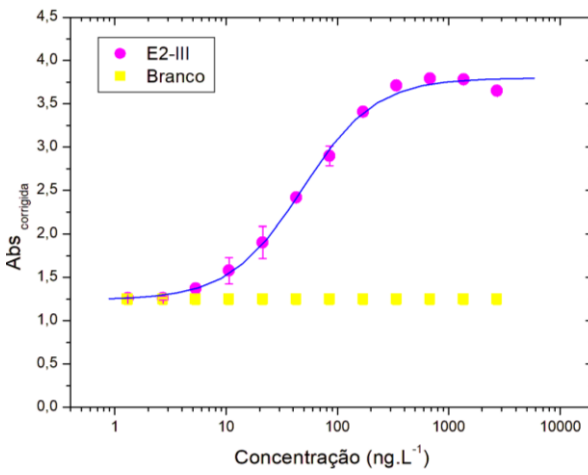
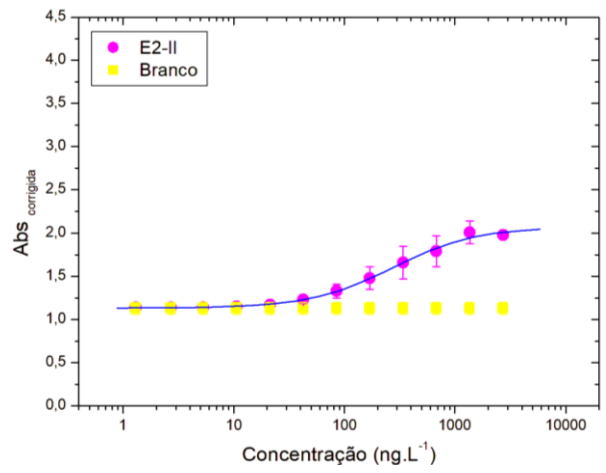
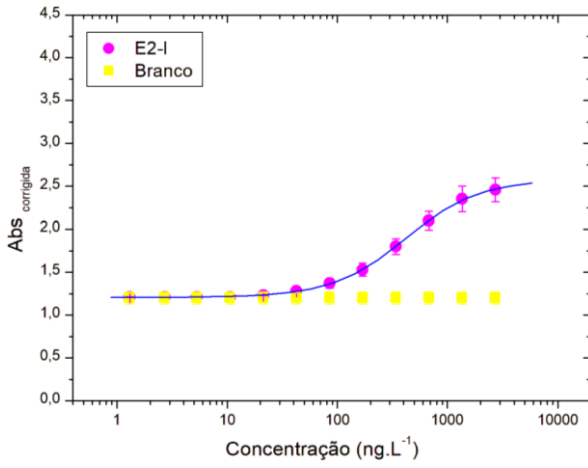
Parâmetros	Amostra	Número de amostras	Teste de normalidade	p-valor	Teste de desvio	p-valor
pH	Bruto	10	Shapiro-Wilk	0,951	T-Student	0,7397
	Tratado	8		0,190		
Condutividade	Bruto	10	Shapiro-Wilk	0,892	T-Student	0,1670
	Tratado	7		0,702		
Sólidos suspensos totais (SST)	Bruto	17	Shapiro-Wilk	0,835	T-Student	0
	Tratado	15		0,076		
Demanda química de oxigênio (DQO) total	Bruto	17	Shapiro-Wilk	0,346	T-Student	0
	Tratado	13		0,472		
Demanda química de oxigênio (DQO) filtrada	Bruto	18	Shapiro-Wilk	0,224	T-Student	0
	Tratado	14		0,620		
Demanda química de oxigênio (DQO) particulada	Bruto	16	Shapiro-Wilk	0,934	T-Student	0
	Tratado	7		0,669		
Nitrogênio total <i>kjeldahl</i> (NTK)	Bruto	19	Shapiro-Wilk	0,759	T-Student	0
	Tratado	15		0,195		
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₃)	Bruto	18	Shapiro-Wilk	0,252	Mann-Whitney	0
	Tratado	14		0,610		
Nitrogênio orgânico	Bruto	18	Shapiro-Wilk	0,099	T-Student	0,0004
	Tratado	7		0,737		
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Bruto	11	Shapiro-Wilk	0,052	T-Student	0,0416
	Tratado	8		0,547		

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

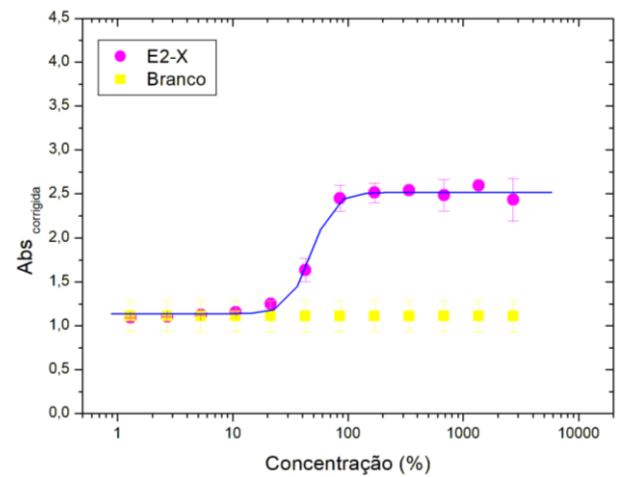
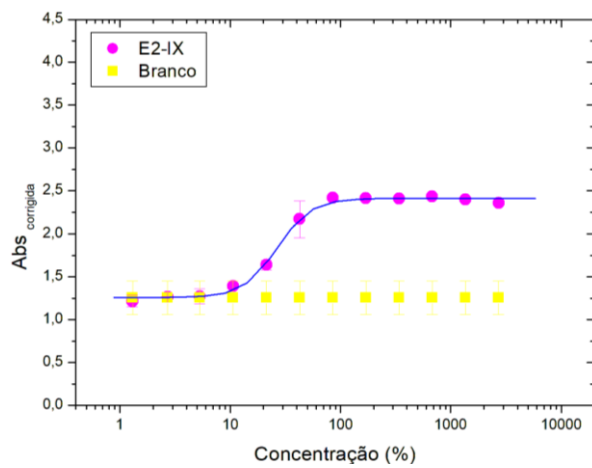
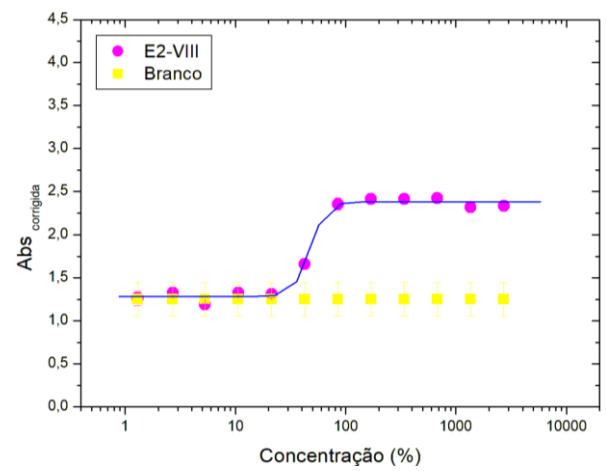
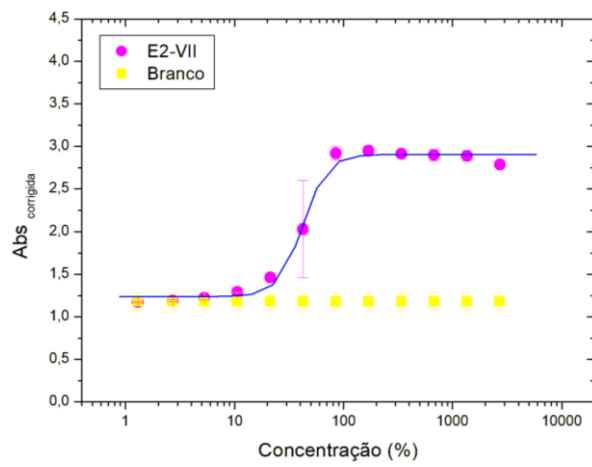
APÊNDICE D – Curva dose resposta de uma das amostras de branco.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

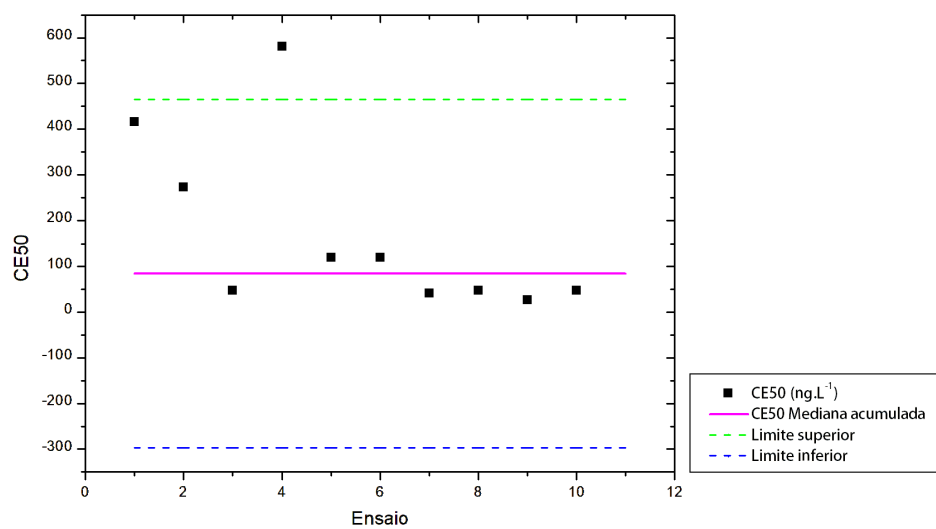
APÊNDICE E – Curva dose-resposta do controle-positivo de 17β-estradiol na faixa de concentração 2724 ng.L⁻¹ a 1,3301 ng.L⁻¹ (continua).

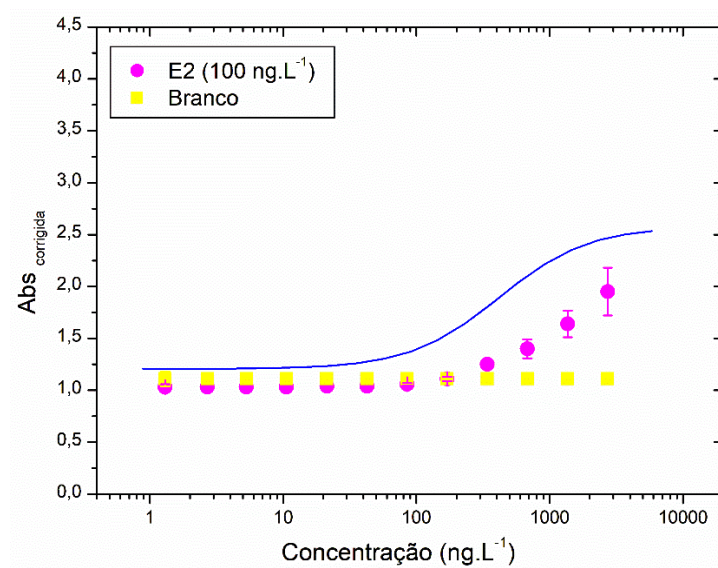


APÊNDICE E – Curva dose-resposta do controle-positivo de 17β -estradiol na faixa de concentração 2724 ng.L^{-1} a $1,3301 \text{ ng.L}^{-1}$ (continuação).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE F – Carta controle para o 17 β -estradiol.

APÊNDICE G – Curva da amostra de recuperação com concentração de 100 ng.L⁻¹.

APÊNDICE H - Estatística descritiva das concentrações de atividade estrogênica do efluente bruto e do efluente tratado.

Amostra	Número de dados	Mediana	Média	(ngEQ-E2.L ⁻¹)				Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
				Mínimo	Máximo	Q1	Q3		
Bruto	19	83,96	149,16	<LD	543,9	31,09	239,1	147,2	98,69
Tratado	17	0,11	21,09	<LD	95,48	<LD	39,44	28,65	135,83

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE I – Concentração de atividade estrogênica, mediana, LD e LQ de cada amostra de efluente bruto e de efluente tratado por coleta.

Data da coleta	Amostra	Concentração (ngEQ-E2.L ⁻¹)	Concentração média (ngEQ-E2.L ⁻¹)	LD (ng.L ⁻¹)	LQ (ng.L ⁻¹)
23/05/2019	EB-I	<LD	<LD	0,17	0,52
		<LD		0,17	0,52
23/05/2019	ET-I	<LD	<LD	0,17	0,52
		<LD		0,17	0,52
03/07/2019	ET-II	<LD	<LD	0,14	0,42
30/07/2019	EB-III	45,40	45,40	0,19	0,57
		15,96		0,14	0,42
14/08/2019	EB-IV	31,09	31,15	0,19	0,57
		31,20		0,14	0,42
14/08/2019	ET-IV	<LD	<LD	0,14	0,42
		<LD		0,14	0,42
18/09/2019	EB-V	36,95	31,75	0,22	0,66
		26,55		0,22	0,66
18/09/2019	ET-V	49,84	38,54	0,22	0,66
		27,24		0,11	0,32
14/10/2019	EB-VI	170,03	516,85	0,1	0,29
		<LD		0,1	0,29
14/10/2019	ET-VI	<LD	<LD	0,22	0,66
		<LD		0,22	0,66
11/11/2019	EB-VII	272,3	272,3	0,22	0,66
		761,4*		0,22	0,66
11/11/2019	ET-VII	<LD	19,12	0,22	0,66
		37,9		0,22	0,66
06/02/2020	EB-VIII	83,96	150,13	0,1	0,29
		216,3		0,1	0,29
06/02/2020	ET-VIII	14,44	7,29	0,1	0,29
		<LD		0,1	0,29
09/03/2020	EB-IX	322,27	161,16	0,1	0,29
		<LD		0,11	0,29
09/03/2020	ET-IX	39,44	50,22	0,1	0,29
		61,00		0,1	0,29
07/12/2021	EB-X	224,66	224,66	0,13	0,41
25/04/2022	EB-XI	543,9	543,9	0,13	0,41
02/05/2022	EB-XII	306,8	306,8	0,13	0,41
		43,83		0,13	0,41
06/06/2022	EB-XIII	239,10	239,1	0,13	0,41
		205,67		0,13	0,41
20/06/2022	EB-XIV	77,60	141,64	0,13	0,41
		120,80*		0,13	0,41

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: * (dados identificados com *outliers*).

APÊNDICE J – Teste de normalidade e de desvio atividade estrogênica para o efluente bruto e para o efluente tratado.

Teste	Amostra	Número de amostras	p-valor
<i>Shapiro-Wilk</i>	Bruto	19	0,0149
	Tratado	17	0,0008
<i>Shapiro-Wilk</i>	Bruto - Estiagem	11	0,0052
	Bruto - Chuva	7	0,7969
<i>Mann-Whitney</i>	Bruto - Estiagem	11	0,15
	Bruto - Chuva	7	
<i>Mann-Whitney</i>	Bruto	19	0,0019
	Tratado	17	

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE K – Estatística descritiva das concentrações de atividade estrogênica do efluente bruto nos períodos de chuva e de estiagem.

Período	Número de dados	Mediana	Média	(ngEQ-E2.L ⁻¹)				Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
				Mínimo	Máximo	Q1	Q3		
Estiagem	11	36,95	90,96	<LD	306,8	26,55	205,67	107,09	117,74
Chuva	7	216,3	184,22	<LD	322,27	83,96	272,30	110,79	60,14

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO A - Materiais, equipamentos e reagentes necessários para o preparo das amostras, das soluções e para a realização do ensaio YES.

	Preparo das amostras	Preparo das soluções	Realização do ensaio YES
<u>Materiais</u>	Vidro âmbar 1L Balão volumétrico 1L Membrana de filtração 0,45 e 0,7 µm Cartucho Strata x 6 mL Cartucho Strata sax 6 mL Vial 5 mL Frasco âmbar 20 mL	Filtro seringa 0,22 µm Seringa descartável Frasco Scott 1L, 500 e 100 mL Frasco âmbar 20 mL Balão volumétrico 1L, 250, 100, 50 e 10 mL Funil de vidro Bastão de vidro Becker 50 mL e 30 mL Provetas de 250, 100, 50 e 10 mL	Ponteira e pipeta de 10 a 100 µL Ponteira e pipeta de 100 a 1000 µL Pipeta multicanal 10 a 200 µL Ponteiras estéreis de 100 e 1000 µL Placa de 96 poços transparentes Frasco para cultivo de células (frasco T) de 50 mL Tubo falcon 50 mL Tubo criogênico 2 mL
<u>Equipamentos</u>	<i>Manifold</i> Bomba à vácuo Fluxo de nitrogênio Capela com sistema de exaustão Filtro de osmose reversa Tira indicadora universal de pH	Balança analítica Autoclave Cabine de segurança biológica ou fluxo laminar Filtro de osmose reversa Freezer e geladeira Espectrofotômetro	Agitador orbital Cabine de segurança biológica A1 II Estufa Leitora de microplacas Espectrofotômetro Vortex
<u>Reagentes</u>	Acetona, acetato de etila, ácido clorídrico (HCl), água deionizada, metanol, etanol, EDTA, fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄), sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄), hidróxido de potássio (KOH), sulfato de magnésio (MgSO ₄), sulfato férrico hidratado (Fe ₂ (SO ₄) ₃), Leucina, L-histidina, adenina, L-arginina – HCl, L-metionina, L-tirosina, L-isoleucina, L-isoleucina, L-lisina – HCl, L-fenilalanina, L-ácido glutâmico, L-valina, L-serina, glicose, ácido L-aspártico, L-treonina, sulfato de cobre, tiamina, piridoxina, pantotenato de cálcio, Inositol, biotina, CPRG, 17β-estradiol.		

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO B – Preparo das soluções e do meio de análise para o ensaio YES

Preparo das soluções do meio de cultivo

Para o preparo de cada solução, os reagentes foram pesados em papel alumínio. Após o preparo das soluções, estas foram esterilizadas e somente abertas em capela de fluxo laminar.

Meio mínimo

O preparo do meio mínimo foi realizado através da adição dos seguintes reagentes em 1L de água deionizada: 13,61 g de KH_2PO_4 , 1,98 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,2 g de KOH peletes, 0,2 g de MgSO_4 , 1 mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (0,04 g.50 mL^{-1} de água deionizada), 0,05 g de L-leucina, 0,05 g de L-histidina, 0,05 g de adenina, 0,02 g de L-arginina-HCl, 0,02 g de L-metionina, 0,03 g de L-tirosina, 0,03 g de L-isoleucina, 0,03 g de L-lisina-HCl, 0,025 g de L-fenilalanina, 0,1g de L-ácido glutâmico, 0,15 g de L-valina, 0,375 g de L-serina.

Solução de vitamina

A solução de vitamina foi preparada pela adição dos seguintes reagentes em 180 mL de água deionizada: 0,008 g de tiamina, 0,008 g de piridoxina, 0,008 de pantotenato de cálcio, 0,04 g de inositol e 20 mL de solução de biotina (0,002 g.100 mL^{-1} de água deionizada).

Solução de glicose

A solução de glicose consistiu na solução de 20% p/v (20g.100 mL^{-1}), adicionando glicose em água deionizada.

Solução de ácido L-aspártico

Solução estoque de 0,004 g. mL^{-1} (04 g.100 mL^{-1}) de ácido aspártico em água deionizada.

Solução de L-treonina

Solução estoque de $24 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0,6 \text{ g}\cdot 25 \text{ mL}^{-1}$) de L-treonina, em água deionizada.

Solução de sulfato de cobre (II)

Solução de 20 mM ($0,5 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) de sulfato de cobre (II) em água deionizada.

Solução de CPRG

A solução estoque de CPRG (*chlorophenol red- β -D-galactopyranoside*) foi preparada na hora do ensaio, cuja concentração é de 10 mg/mL em água deionizada.

Preparação do meio de cultivo

O meio de cultivo consiste na adição de: 5 mL de solução de glicose, $1,25 \text{ mL}$ de solução de ácido L-aspártico, $500 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de vitamina, $400 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de L-treonina, $125 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de sulfato de cobre (II) e 45 mL de meio mínimo. As soluções para preparo do meio de cultivo somente devem ser abertas em capela de fluxo laminar, previamente preparada conforme o ANEXO A.

Conservação das soluções

O meio mínimo, as soluções de glicose, ácido L-aspártico e L-treonina foram esterilizadas em frascos de vidro a 121°C por 15 min . As soluções de sulfato de cobre (II) e de vitamina foram esterilizadas por filtração em membrana de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$, pois são degradadas pelo calor.

As soluções de L-treonina e vitamina e o meio de cultivo foram armazenadas à temperatura de 4°C . As demais soluções foram armazenadas em temperatura ambiente.

Preparo do meio com a cultura de levedura

A solução contendo a levedura foi preparada em frasco estéril de 50 mL, adicionando 4 mL do meio de cultivo e 3 mL de levedura.

Foi lida a absorvância em 620 nm desta solução, correspondente a turbidez, em espectrofotômetro, previamente zerado com água deionizada.

A leitura da absorvância é uma adaptação do método original proposto por Routledge e Sumpter (1996) para facilitar a etapa de contagem de células da levedura, que é realizada em microscópio. A leitura obteve resultados satisfatórios em pesquisas, como nas realizadas por Bistan *et al.* (2012) e Frische *et al.* 2009.

Esta deve ser próxima de 1 para realização do ensaio.

O procedimento de preparo do meio de análise foi realizado em capela de fluxo laminar. A alíquota contendo a levedura utilizada para leitura da absorvância deve ser descartada.

Preparo do meio de análise para o ensaio YES

O meio de análise consistiu na adição de 20 mL de meio de cultivo, 250 μL da solução de CPRG ($10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 25 μL do meio contendo a levedura, em tubo estéril ou previamente esterilizado.

O meio de análise foi feito em tubos do tipo falcon estéreis ou, dependendo do volume necessário, em frascos de vidro previamente esterilizados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minuto.