

**unesp**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO  
CLARO**



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**TOXICIDADE DE EFLUENTES DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE  
ESGOTO (ETE) ANTES E APÓS DESINFECÇÃO POR PROCESSOS  
OXIDATIVOS AVANÇADOS**

**LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO**

**Rio Claro – SP  
2021**



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

TOXICIDADE DE EFLUENTES DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE  
ESGOTO (ETE) ANTES E APÓS DESINFECÇÃO POR PROCESSOS  
OXIDATIVOS AVANÇADOS

**LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO**

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales  
**Co-orientadora:** Profa. Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Biologia Celular e Molecular).

S697t

Sommaggio, Laís Roberta Deroldo

Toxicidade de efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) antes e após desinfecção por processos oxidativos avançados /

Laís Roberta Deroldo Sommaggio. -- Rio Claro, 2021

208 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

Coorientadora: Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

1. Ecotoxicologia. 2. Tratamento de efluentes. 3. Processos oxidativos avançados. 4. Bioensaios. 5. Toxicidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: TOXICIDADE DE EFLUENTES DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO (ETE)  
ANTES E APÓS DESINFECÇÃO POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

**AUTORA: LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO**

**ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES**

**COORIENTADORA: DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Profa. Dra. ALEXEIA BARUFATTI GRISOLIA (Participação Virtual)  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO (Participação Virtual)  
Departamento de Fonoaudiologia / FFC/Marília - Unesp

Prof. Dr. RENATO FALCÃO DANTAS (Participação Virtual)  
Coordenadoria de Meio Ambiente / Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. ROBERTA DE SOUZA POHREN (Participação Virtual)  
Instituto de Oceanografia / Universidade Federal do Rio Grande

Rio Claro, 09 de abril de 2021

Dedico este trabalho a todos os Pesquisadores(as) e Professores(as) que utilizam a ciência e a educação como um instrumento transformador da sociedade.

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento e término deste trabalho só foi possível devido as parcerias estabelecidas ao longo dos anos e a colaboração de muitos amigos. Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto, seja academicamente ou emocionalmente. Dessa forma, expresso meus carinhosos agradecimentos:

Aos meus pais, Maria Conceição e José Roberto, pela estrutura familiar, por sempre investirem na minha educação, por acreditarem nos meus sonhos, e estarem sempre presentes. Sem esse suporte eu não poderia ter chegado até aqui. Gratidão pela vida privilegiada que me proporcionaram.

Aos meus queridos irmãos, por estarem sempre presentes, pela parceria diária, por me aguentarem mesmo em momentos que nem eu me aturava. Obrigada em especial a Laila que muitas vezes também colocou a mão na massa pra me ajudar nesse processo. Também não posso deixar de agradecer ao suporte emocional dos meus pets, Amora, Framboesa, Kimba e Billy, só quem tem bichinhos consegue entender a importância deles para a saúde mental.

Aos meus avós (*In memoriam*), que acompanharam de perto toda essa jornada, mas infelizmente não estão aqui agora para verem essa etapa concluída, que mesmo sem entenderem bem o que eu fazia, sempre ficaram preocupados com o meu bem-estar. Especialmente à minha vó Eda, que sempre foi muito presente em minha vida e estava sempre disposta a me aconselhar. Agradeço por tudo que ela fez por mim e pela minha família, pelos mimos recebidos, pelo apoio nos estudos, pelas rezas diárias, pela torcida para a minha realização pessoal e profissional. Palavras não são capazes de expressar a minha gratidão e amor.

Ao João, pelas muitas idas ao laboratório de final de semana, pela companhia nas finais de ano que acabei passando no laboratório, pelo suporte emocional, pelo carinho e cuidado que sempre teve comigo, e principalmente por entender as minhas escolhas e me apoiar nessa jornada de ser cientista em um país que muitas vezes não nos reconhece. Gratidão. Agradeço também a família do João que sempre me acolheu, e se tornou uma extensão da minha.

Às minhas amigas da vida, Ana Carolina, Andrea, Rê, Gê e Marina, pelos momentos de afeto e conversas, por entenderem muitas vezes a minha ausência e pelo apoio. Sou extremamente grata pela nossa amizade. Também agradeço aos meus amigos da escola, que mesmo sem contato diário, sei que posso contar com eles, obrigada pelos longos anos de amizade e pelas discussões no grupo de WhatsApp (as vezes plausíveis, outras nem tanto).

Aos meus amigos da época de graduação (CBI2009), no qual fiz amizades para levar para a vida, em especial minhas amigas Aline, Elen, Paula e Vanessa, por todos os momentos vividos longo desses anos.

Ao Instituto de Biociências da UNESP e ao Laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) por fornecer toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2016/22483-1, pois sem esse apoio essa pesquisa não poderia ter sido desenvolvida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À BRK Ambiental, pelas amostras de efluentes.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, pelos ensinamentos diários, pelas sugestões para a melhora não só deste trabalho, mas do grupo, pelo entusiasmo com as nossas pesquisas, por acreditar e confiar em mim, por ser minha mãe científica, afinal, são 10 anos de convivência, muito mais que uma orientadora, ela é uma amiga. Agradeço pela paciência, por sempre me incentivar nessa jornada e por todo tempo dedicado a esse trabalho e ao nosso grupo, você é uma inspiração.

À Dânia, minha co-orientadora desde a iniciação científica, gratidão pelos anos de ensinamentos e sugestões, pelos experimentos conjuntos, por estar sempre disposta a me ajudar, por me acompanhar durante todo esse tempo, você é um exemplo de pesquisadora pra mim. Sou grata pela sua amizade, carinho e coorientação.

Ao Prof. Dr. Renato Falcão Dantas, por acreditar na minha capacidade, por nos propor a parceria nesse projeto, por toda infraestrutura disponibilizada para realização dos ensaios oxidativos avançados, pelas sugestões e correções. Agradeço também a Jacqueline, pela ajuda com as coletas e os tratamentos das amostras. Gratidão por essa parceria.

Ao Prof. Dr. Carlos Emílio Levy pela grande colaboração prestada há anos na identificação dos microrganismos, por continuar acreditando na nossa parceria. Muito obrigada.

À Patrícia Moraes Sinohara Souza, minha querida dupla, pela parceria durante a realização dos nossos ensaios com cultura de células, pelas horas de fluxo laminar, pelas risadas, por sempre estar disposta a realizar experimentos, mesmo as vezes sendo em feriados ou domingos às 5 horas da manhã. Gratidão pela amizade, por deixar as coisas mais divertidas e por compartilhar seu conhecimento.

À Adriana, que sempre me auxiliou e me ajudou nas coletas e inúmeros experimentos. Sempre disposta a colaborar não só no meu projeto, mas nos projetos do grupo. Obrigado pelas

horas dedicadas a me acompanhar nas coletas, nos processos de extração, nos experimentos mesmo em finais de semana. Gratidão por toda amizade e ajuda durante todos esses anos.

Aos “BFF”, Cleiton, Lê Rocha e Nádia, que foram muito importantes nesses últimos anos, por estarem presentes no dia a dia do laboratório e, quando isso não foi mais possível pela “presença” virtual. Sou grata pela nossa amizade, troca de conhecimentos acadêmicos e conversas aleatórias.

Aos meus amigos Raquel, Michele, Bairral, Jorge, Márcia, Mary e Letícia Gonçalves pela amizade que se iniciou no laboratório de Mutagênese e que levamos para a vida, gratidão por todos esses anos de companheirismo, congressos e aprendizagem conjunta.

Às minhas co-orientadas Tamara, Gaby e Rafaela, que ajudaram no meu crescimento como pesquisadora e permitiram que eu tivesse o início da minha experiência como orientadora. Aprendi muito com vocês.

A todos os meus amigos e companheiros mutagênicos e ex-mutagênicos: Lê Gigeck (obrigada em especial pela ajuda com Ames), Jaque Matos, Franco, Camila, William, Matheus Mantuanelli, Jaque Bianchi, Mileni, Samantha, Gabriel, Giovanna, Kemellyn, Letícia Rosa, Ana Cristina, Ana Paula, Maria Gabi, Mariana e Matheus G.

Aos funcionários e professores do Departamento de Biologia pelo convívio, auxílios e aprendizagem.

Enfim, gratidão a todos que de alguma forma participaram da realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos, sem vocês nada disso seria possível.

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes”. (Paulo Freire)

## RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de águas residuais em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) são fundamentais para a minimização da poluição dos recursos hídricos. Dentre as novas tecnologias, destacam-se os Processos Oxidativos Avançados (POAs), como a ozonização e a radiação ultravioleta (UV) associada ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esses processos baseiam-se na utilização de espécies altamente oxidantes, para promover a degradação mais efetiva de poluentes e a desinfecção de microrganismos patogênicos dos efluentes. A eficácia dos tratamentos de efluentes também é essencial para um reaproveitamento seguro dessas águas (reuso). Contudo, os POAs podem gerar compostos tóxicos que inviabilizam a reutilização das águas e comprometem o corpo d'água receptor. Nesse sentido, os ensaios realizados com indicadores biológicos de alta performance são ferramentas importantes para serem empregados na avaliação e certificação da isenção de toxicidade de efluentes submetidos a processos de tratamentos avançados. Além de medir o poder desinfetante do sistema utilizado, é necessário também monitorar os possíveis impactos ambientais que esses processos possam causar. Amostras de efluentes de duas ETEs da cidade de Limeira, de características distintas (ETE Municipal e ETE Unicamp) e coletados sazonalmente (período chuvoso e seco), foram submetidas aos tratamentos com ozônio ou com UV/ $H_2O_2$ , por períodos de 20 (T1) e 40 (T2) minutos. Diferentes bioensaios foram utilizados para a avaliação das amostras, antes da aplicação dos POAs e após esses tratamentos. A fitotoxicidade das amostras foi avaliada por ensaios de germinação e alongamento do hipocótilo e radícula em *Lactuca sativa*. Os ensaios de genotoxicidade (Cometa e Micronúcleo) foram realizados em cultura de células humanas HepG2/C3A. Ainda, foram avaliados os potenciais mutagênicos e estrogênicos dos extratos das amostras, pelo ensaio de *Salmonella*/microsoma e leveduras recombinantes (YES), respectivamente. Além disso, foi realizada uma caracterização microbiológica para avaliar os microrganismos persistentes no efluente final das ETEs. Os resultados da análise microbiológica mostraram que o maior tempo de ozonização e o tratamento com UV/ $H_2O_2$  foram eficientes para a desinfecção do efluente do indicador *Escherichia coli*. O tratamento com UV/ $H_2O_2$  foi mais eficiente na desinfecção da maioria dos microrganismos que o tratamento com ozônio. *Bacillus* sp. foi o microrganismo mais resistente identificado, já que foi encontrado mesmo após o maior tempo de reação (T2) dos tratamentos de  $O_3$  e UV/ $H_2O_2$ . Os resultados com *Lactuca sativa* mostraram inibição do crescimento da raiz, para todas as amostras da ETE Municipal-período seco. Os resultados do ensaio do cometa mostraram que as amostras da ETE Municipal-período seco, submetidas ao

tratamento de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T1 e T2), induziram efeitos genotóxicos significativos em células HepG2/C3A, quando comparados ao controle negativo (CN). Com relação ao ensaio do MN, foi observado uma indução significativa desses elementos, em todos os tratamentos da ETE Unicamp e da ETE Municipal-período seco, quando comparados ao CN. A presença de brotos nucleares foi significativa para todos os tratamentos realizado da ETE Unicamp e para os tratamentos com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da ETE Municipal-período seco. A presença de mais de uma alteração por célula (alterações compostas– ex. MN e broto nuclear, MN e ponte, entre outras) foi significativa para o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T1) da ETE Municipal-período seco, quando comparado ao CN. A avaliação do total das alterações (somatória de todos os eventos) foi significativa para todos os tratamentos da ETE Unicamp; tratamentos com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T 1 e T2) da ETE Municipal-período seco; e para as amostras de efluente, antes da aplicação dos POAs, O<sub>3</sub>T2 e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T2 da ETE Municipal-período chuvoso. Foram observadas atividades estrogênicas para a maioria dos efluentes coletados antes da aplicação dos POA e para os efluentes coletados após o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os efluentes submetidos a ozonização não demonstraram tal atividade. Com relação ao ensaio com *Salmonella*, foi observado potencial mutagênico para as linhagens TA98 e TA100, com ativação metabólica, nas amostras tratadas com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Frente ao exposto, foi observado que o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou um maior poder de desinfecção das amostras, mas também um maior efeito tóxico, quando comparado com o tratamento com O<sub>3</sub>. Dessa forma, os tratamentos que utilizam POAs devem levar em consideração não somente o poder desinfetante do tratamento, mas os possíveis impactos que os mesmos possam causar ao ambiente e à saúde humana.

**Palavras-chave:** Ozonização; UV/peróxido de hidrogênio; Cultura de células HepG2/C3A; Fitotoxicidade; *Lactuca sativa*; Genotoxicidade; Estrogenicidade; *Salmonella*/microsoma.

## ABSTRACT

The development of new technologies for the treatment of wastewater in Wastewater Treatment Plants (WWTP) is essential for the minimization of the pollution water resources. Among the new technologies, the Advanced Oxidative Processes (AOPs) are highlighted, such as ozonation and ultraviolet radiation (UV) associated with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). AOPs are based on the use of highly oxidizing species to promote the most effective degradation of pollutants and the disinfection of pathogenic microorganisms from the effluents. The efficiency of the effluent treatment is important for the safe reuse of these waters. However, AOPs can generate toxic compounds that make water reuse unfeasible and compromise the receiving water body. In this sense, the tests carried out with high performance biological indicators are important tools to be used in the evaluation and certification of the toxicity exemption of effluents submitted to AOP. In addition to measuring the disinfectant power of the system used, it is necessary to monitor the possible environmental impacts that these processes may cause. Effluent samples from two WWTPs in the Limeira city, with different characteristics (Municipal WWTP and Unicamp WWTP) and collected in a rainy and dry period were subjected to treatments with ozone or UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, for periods of 20 (T1) and 40 (T2) minutes. Different bioassays were used for the evaluation of the samples, before the application of the AOPs and after these treatments. The phytotoxicity of the samples was evaluated by germination and elongation tests of the hypocotyl and radicle in *Lactuca sativa*. Genotoxicity assays (comet and micronucleus) were performed in human HepG2/C3A cell culture. The mutagenic and estrogenic potentials of the extracts of the samples were evaluated by the *Salmonella*/microsome assay and Yeast Estrogen Screen (YES), respectively. In addition, a microbiological characterization was carried out to assess the persistent microorganisms in the final effluent of the WWTPs. The results of the microbiological analysis showed that the longer ozonation time and the treatment with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were efficient for the disinfection of the effluent, according to the tests carried out with the *Escherichia coli* indicator, with the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> being even more efficient in the disinfection than ozone treatment. *Bacillus* sp. was the most resistant microorganism identified, being found even after treatments with O<sub>3</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results with *Lactuca sativa* showed inhibition of root growth, for all samples of the Municipal WWTP-dry period. The results of the comet assay showed that the samples from Municipal WWTP-dry period, submitted to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (T1 and T2), induced significant genotoxic effects in HepG2/C3A cells, when compared to the negative control (NC). Regarding the MN test, a significant MN induction of this elements was observed in all treatments of the Unicamp WWTP and the Municipal WWTP-dry period, when compared to

the NC. The presence of nuclear bud was significant for all treatments carried out from Unicamp WWTP and for treatments with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from Municipal WWTP-dry period. The presence of more than one alteration per cell (composite alterations – e.g. MN and nuclear bud, MN and bridge, among others) was significant for the treatment with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T1) of the Municipal WWTP-dry period, when compared to the NC. The evaluation of the total alterations (sum of all events) was significant for all treatments of the Unicamp WWTP; treatments with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T1 and T2) from the Municipal WWTP-dry period; and the effluent samples before the application of AOP (O<sub>3</sub>T2 and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T2) from the Municipal WWTP-rainy period. Estrogenic activities were observed for most effluents collected before the application of AOP and for effluents collected after treatment with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The effluents subjected to ozonation did not show estrogenic activity. Regarding the *Salmonella* assay, mutagenic potential was observed for the TA98 and TA100 strains, with metabolic activation, in the samples treated with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Based on these results, it was observed that treatment with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed greater disinfection power of the samples, but also a greater toxic effect, when compared with O<sub>3</sub> the treatment with the O<sub>3</sub>. Thus, treatments using AOPs must consider not only the disinfectant power of the treatment but the possible impacts that they may have on the environment and human health.

**Keywords:** Ozonation;UV/hydrogen peroxide; HepG2/C3A cell culture; phytotoxicity; *Lactuca sativa.*; Genotoxicity; estrogenic potential; *Salmonella*/microsoma.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Distribuição global de água. ....	21
<b>Figura 2:</b> Índice de disponibilidade de água per capita (m <sup>3</sup> /pessoa/ano). ....	22
<b>Figura 3-</b> Demanda global de água por setor (projeção até 2040). ....	24
<b>Figura 4-</b> Esquema da expressão de estrogênio induzida na levedura, utilizada no ensaio YES. ....	38
<b>Figura 5 -</b> Ilustração de revertentes em <i>S. typhimurium</i> .....	40
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática do reator de ozônio (A) e do reator de UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (B). ....	44
<b>Figura 7-</b> Experimento de oxidação avançada do efluente secundário com UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	45
<b>Figura 8 -</b> Experimento de oxidação avançada do efluente secundário com ozônio. ....	45
<b>Figura 9-</b> Amostras dos efluentes antes e após tratamentos oxidativos avançados. ....	46
<b>Figura 10 -</b> Ilustração de parte do procedimento realizado para a extração em fase sólida com cartucho Oasis HLB. ....	47
<b>Figura 11-</b> Colunas de vidro contendo as amostras dos efluentes conectadas aos seus respectivos cartuchos para extração. ....	48
<b>Figura 12-</b> Eluição (A) e secagem (B) dos extratos. ....	48
<b>Figura 13-</b> Ensaio com <i>Lactuca sativa</i> . ....	52
<b>Figura 14-</b> Representação das análises realizadas no Software Comet Assay IV. ....	54
<b>Figura 15-</b> Esquema representativo das principais alterações encontradas no ensaio e, análise da proliferação celular pela contagem da quantidade de núcleos. ....	56
<b>Figura 16 -</b> Colônias de bactérias revertentes. ....	59
<b>Figura 17 -</b> Fluxograma 1: Referente a primeira parte experimental, onde testou-se os efluentes in natura. ....	60
<b>Figura 18-</b> Fluxograma 2: Referente a segunda parte experimental, no qual após as coletas foram realizados os processos de extração .....	61
<b>Figura 19:</b> Amostras de efluente da ETE Unicamp, antes e após os processos de oxidação avançada. ....	64
<b>Figura 20:</b> Amostras do efluente da ETE Municipal (Águas da Serra da cidade de Limeira), antes e após os processos de oxidação avançada. ....	64
ARTIGO 1	
<b>Figure 1:</b> Schematic representation of the ozone reactor (A) and the UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> reactor (B). ....	75

**Figure 2.** Enterobacteria presence during ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of secondary effluents. (a): GW first sampling; (b): GW second sampling ; (c): UW first sampling; (d): UW second sampling; (e): UW third sampling .....81

**Figure 3.** Gram Negative non-fermenting bacteria and *Aeromonas* spp. during ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of secondary effluents. (a): GW first sampling; (b): GW second sampling; (c): UW first sampling; (d): UW second sampling; (e): UW third sampling.....86

**Figure 4.** Gram Positive bacteria during ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of secondary effluents. (a): GW first sampling; (b): GW second sampling; (c): UW first sampling; (d): UW second sampling; (e): UW third sampling .....90

## ARTIGO 2

**Figura 1:** Porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa*, expostas a amostras de efluentes obtidas antes e após os tratamentos oxidativos avançados .....119

**Figura 2:** Média do crescimento das radículas de *Lactuca sativa* expostas às amostras de efluentes antes e após, tratamentos oxidativos avançados de ozonização (O<sub>3</sub>) ou radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) .....121

**Figura 3:** Média do crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa*, expostas às amostras de efluentes antes e após tratamentos oxidativos avançados de ozonização (O<sub>3</sub>) ou radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).....123

**Figura 4:** Células binucleadas avaliadas pelo ensaio de MN em células HepG2/C3A.....134

## ARTIGO 3

**Figura 1:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L), para extratos das amostras da ETE Municipal período chuvoso. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.....153

**Figura 2:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L), para os extratos das amostras da ETE Municipal período seco. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.....155

**Figura 3:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L), para os extratos das amostras da ETE UNICAMP período chuvoso. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.....157

**Figura 4:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L) para os extratos das amostras da ETE UNICAMP período chuvoso. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.....157

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resumo dos bioensaios utilizados no presente estudo. ....	41
<b>Tabela 2:</b> Amostras utilizadas da ETE Unicamp e ETE Municipal (antes e após POA) e tipo de amostra empregada em cada bioensaio. ....	49
<b>Tabela 3:</b> Caracterização de amostras do efluente secundário obtidos na estação de tratamento de esgoto da Faculdade de Tecnologia da Unicamp (Limeira, SP- Brasil), antes e após os processos de oxidação avançada. ....	62
<b>Tabela 4:</b> Caracterização de amostras do efluente secundário obtidos na estação de tratamento de esgoto Municipal, Águas da Serra da cidade de Limeira (SP-Brasil), antes e após os processos de oxidação avançada. ....	63
ARTIGO 1	
<b>Table 1.</b> Reports of pathogens group and associated diseases. ....	71
<b>Table 2.</b> Physicochemical characterization of secondary effluent samples. ....	77
<b>Table 3.</b> Average monthly data of precipitation (mm) and temperature (°C) in the city of Limeira SP (Brazil) during the sampling periods. ....	78
<b>Table 4.</b> Genera of pathogens that survived the advanced oxidative treatments studied here, being related to some of type resistance described in the literature. ....	95
<b>Table SM1.</b> Residual H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> during the experiment time. ....	107
<b>Table SM2.</b> Climatological averages of the city of Limeira-SP at the time of samples collection. ....	107
ARTIGO 2	
<b>Tabela 1:</b> Precipitação média, em milímetros, e temperaturas médias (°C) mensais dos anos em que as coletas foram realizadas. ....	112
<b>Tabela 2:</b> Caracterização das amostras de efluentes obtidos na ETE Unicamp e na ETE Municipal, ambas da cidade de Limeira (SP-Brasil), antes e após aplicação dos processos oxidativos avançados. ....	114
<b>Tabela 3:</b> Índice de crescimento relativo da radícula de <i>Lactuca sativa</i> expostas às amostras de efluentes, antes e após tratamentos oxidativos avançados de ozonização (O <sub>3</sub> ) ou radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio (UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). ....	121
<b>Tabela 4:</b> Viabilidade celular do ensaio do cometa, realizado em células HepG2/C3A mantidas em cultura. ....	124
<b>Tabela 5:</b> Momento da cauda de Olive, quantificados no ensaio do cometa realizado com células HepG2/C3A mantidas em cultura. ....	125

**Tabela 6:** Porcentagem de DNA na cauda (*tail intensity*), quantificados no ensaio do cometa realizado com células HepG2/C3A mantidas em cultura.....125

**Tabela 7:** Alterações genotóxicas encontradas em células HepG2/C3A expostas a amostras de efluente das ETEs antes e após aplicação de processos oxidativos avançados.....130

### ARTIGO 3

**Tabela 1:** Precipitação média em milímetros de chuva e temperatura média (°C) mensal dos anos em que foram realizadas as coletas.....148

**Tabela 2:** Resultados obtidos pela contagem dos revertentes por placa, para as linhagens TA 98 e TA 100, com e sem sistemas de metabolização S9, submetidas aos extratos das amostras coletadas na ETE Unicamp, antes e após aplicação de processos oxidativos avançados, por 40 minutos. ....161

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2AA – 2- aminoantraceno

4NQO – óxido de 4-nitroquinolina

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AE – Alteradores endócrinos

ANOVA – Análise de variância

ASTM – Sociedade Americana para Testes e Materiais

CAS – Chemical Abstracts Service

CE- Contaminantes Emergentes

CN – Controle negativo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CP – Controle positivo

DMSO - Dimetilsulfóxido

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FAU – unidade padrão para turbidez

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

ISO - International Standard Organisation

M – Molar

mL – Mililitros

mm – Milímetros

MMS – Metilmetano Sulfonato

MN – Micronúcleo

Mugal – 4-Metilumbeliferil-galactopiranosil

NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

O<sub>3</sub> – ozonização

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

POA- Processo oxidativo avançado

pH – Potencial hidrogeniônico

S9 – Fração microsomal

SALANAL – *Salmonella Assay Analysis*

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

UFC – Unidade Formadora de Colônia

USEPA – U.S. Environmental Protection Agency

UV – Radiação ultravioleta

WHO - World Health Organization

YES – *Yeast estrogen screen*

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
2. Objetivos.....	20
3. Revisão bibliográfica.....	21
3.1 Disponibilidade, uso e poluição de recursos hídricos.....	21
3.2 Tratamento de Esgoto .....	25
3.3 Reuso da água e os processos oxidativos avançados .....	27
3.4 Diretrizes normativas de reuso e o monitoramento de microrganismos patogênicos	31
3.5 Monitoramento biológico: uma importante ferramenta para avaliação de ecotoxicidade .....	34
3.5.1 Ensaios <i>in vivo</i> com o bioindicador <i>Lactuca sativa</i> .....	34
3.5.2 Ensaios <i>in vitro</i> com células humanas.....	35
3.5.3 Ensaios com leveduras recombinantes .....	37
3.5.4 Ensaios de mutagenicidade com <i>Salmonella</i> .....	39
4. Materiais e métodos.....	42
4.1 Efluentes utilizados no estudo .....	42
4.2 Tratamentos oxidativos avançados .....	43
4.3 Análises físico-químicas .....	46
4.4 Análises microbiológicas .....	49
4.4.1 Diluição, semeadura e identificação de microrganismos das amostras.....	49
4.5 Extração em fase sólida (EFS).....	46
4.6 Ensaios biológicos .....	51
4.6.1 Bioensaio com <i>Lactuca sativa</i> .....	51
4.6.2 Ensaios com cultura de células.....	52
4.6.2.1 Ensaio do cometa .....	53
4.6.2.2 Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese .....	55
4.6.3 Ensaio com leveduras recombinantes – YES ( <i>Yeast Estrogen Screen</i> ).....	57

4.6.4	Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma – modificação de Kado (microsuspensão).....	58
4.7	Fluxograma referente as etapas da pesquisa .....	60
5.	Resultados e discussão .....	62
5.1	Caracterização do efluente secundário, antes e após o emprego de processos oxidativos avançados (POA).....	62
	Artigo 1: Avaliação da remoção de bactérias patogênicas de efluentes secundários durante a ozonização e UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	678
	Artigo 2: Monitoramento do potencial fitotóxico e genotóxico de águas residuárias submetidas a processos oxidativos avançados.....	107
	Artigo 3: Investigação dos potenciais estrogênicos e mutagênicos de efluentes secundários tratados por processos oxidativos avançados .....	143
7.	Conclusões gerais .....	169
	ANEXO 1 .....	172
8.	Referências bibliográficas .....	173

## 1. INTRODUÇÃO

---

O crescimento populacional, o aumento da industrialização, as práticas agrícolas e a urbanização levam a um aumento da demanda por água e, conseqüentemente, um grande acréscimo na quantidade de água residual gerada. Essas águas residuais devem ser tratadas em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), antes de serem lançadas nos recursos hídricos receptores. O tratamento convencional dessas águas visa reduzir os contaminantes ali presentes e proteger a saúde pública e ambiental, pela remoção de xenobiontes, nutrientes e patógenos (LEVINE; ASANO, 2004; KIRK et al., 2002).

Uma das principais fontes de contaminação das águas superficiais são os efluentes lançados pelas ETEs, onde muitos xenobióticos não são efetivamente removidos pelos processos de tratamento convencional (CASTIGLIONE et al., 2006; RADJENOVIC et al., 2009), resultando em grande risco para os sistemas ecológicos e para a saúde humana. Além disso, devido à má qualidade e a atual escassez de água, há também uma grande necessidade de recuperar os efluentes advindos das atividades antrópicas, para que haja melhora no gerenciamento dos recursos hídricos destinados ao consumo humano (MENESES; PASQUALINO, CASTELLS, 2010). Dessa forma, os processos para a recuperação e reutilização de águas residuais, que são realizados nas ETEs, devem ser eficazes para a geração de um efluente final de qualidade, que possa ser utilizado para outros usos não potáveis, poupando volumes significativos de água doce que seriam desperdiçados para esses fins (SALA; SERRA, 2004). A água de reuso pode substituir a água doce em práticas tradicionais como, por exemplo, irrigação agrícola e paisagística, aplicações industriais, limpeza urbana, combate a incêndios, construção civil, entre outras (ASANO et al., 2002). Dessa forma, para evitar a contaminação das águas superficiais por xenobióticos e, pensando no reaproveitamento desses efluentes para o uso antrópico, há uma grande necessidade de desenvolvimento de tecnologias eficazes para o tratamento dos efluentes gerados nas ETEs.

O tratamento terciário de esgoto sanitário é definido como um tratamento adicional para a remoção de substâncias e microrganismos remanescentes do tratamento secundário convencional. A escolha do método de tratamento terciário depende do uso potencial do efluente tratado, da natureza do esgoto (doméstico ou industrial), da viabilidade ambiental e econômica de cada método aplicado no tratamento (TCHOBANOGLIOUS; BURTON, 1991; LUO et al., 2014). Além disso, a desinfecção de águas residuais é uma etapa fundamental que garante a qualidade do efluente tratado e a diminuição dos riscos potenciais destes efluentes tanto para a saúde humana como para o ambiente (RAGAZZO et al., 2017).

Os processos de oxidação avançada (POAs) são muito utilizados no tratamento de efluentes para a remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos, melhorar a biodegradabilidade de efluentes industriais (RIZZO, 2011) e para a desinfecção do efluente final (ETCHEPARE et al., 2014). No entanto, a oxidação parcial de poluentes orgânicos presentes nos efluentes pode resultar na formação de compostos intermediários mais tóxicos que os compostos inicialmente presentes. Dessa forma, é necessário que os POAs sejam cuidadosamente operados e monitorados, inclusive por bioensaios ecotoxicológicos, para que possa ser avaliada a toxicidade final dos efluentes gerados (RIZZO, 2011). Por isso, torna-se necessário, além da aplicação de metodologias eficientes de tratamento e desinfecção dos efluentes, o desenvolvimento de ensaios que permitam verificar a toxicidade da amostra para os organismos vivos. Os bioensaios são essenciais para avaliar riscos e biodisponibilidade das substâncias presentes em amostras ambientais, pois as análises químicas avaliam unicamente a presença e a concentração dos químicos no ambiente (MOREIRA et al., 2008), e não seus efeitos sobre os organismos expostos.

A importância deste estudo reside no fato de que alguns agentes desinfetantes, embora eliminem microrganismos patogênicos, também podem oxidar os contaminantes presentes nas amostras, gerando, dependendo das substâncias presentes no efluente e das doses do desinfetante usado, compostos ainda mais tóxicos e genotóxicos que os efluentes originais ou a mistura avaliada (MONARCA et al., 2000). Dessa forma, todos os sistemas de desinfecção propostos pelas ETE, devem passar por uma bateria de testes prévios, que possam avaliar os possíveis impactos ecotoxicológicos de seus efluentes. Os processos e os tempos de desinfecção adotados devem ser os mais adequados possíveis para o tipo tratamento realizado, de modo a garantir a minimização de possíveis efeitos adversos ao corpo hídrico receptor, à biota associada, bem como às possibilidades de reuso dessa água. Assim, os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos permitem identificar os limites seguros e aceitáveis do uso de processos oxidativos avançados no tratamento de efluentes, garantindo, assim, o lançamento seguro do efluente no ambiente aquático e a sua possível reutilização, sem prejuízo à saúde humana.

## 2. OBJETIVOS

---

Neste estudo, foi avaliado o potencial tóxico de efluentes sanitários com características físico-químicas distintas, antes e após a aplicação de processos oxidativos avançados (ozonização e radiação UV associada ao peróxido de hidrogênio), em dois diferentes períodos de desinfecção. Para isso, esta pesquisa teve os seguintes objetivos:

- Caracterizar a população microbiológica do efluente, antes e após os processos de desinfecção por oxidação avançada;
- Avaliar a efetividade dos processos de desinfecção, por meio da caracterização microbiológica das bactérias presentes nos efluentes, antes e após os tratamentos;
- Avaliar a fitotoxicidade das amostras de efluentes, antes e após tratamentos oxidativos, por meio de ensaios com bioindicador *Lactuca sativa*;
- Avaliar o potencial genotóxico das amostras dos efluentes, antes e após a aplicação dos processos de desinfecção, por meio dos ensaios do cometa e do micronúcleo, realizados com células de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A) mantidas e cultura;
- Avaliar o potencial estrogênico das amostras dos efluentes, antes e após os tratamentos por processos oxidativos avançados, por meio de ensaios com levedura recombinante YES;
- Avaliar a mutagenicidade das amostras, antes e após os tratamentos oxidativos avançados, pelo ensaio com *Salmonella*/microsoma (Kado);
- Determinar o tempo de desinfecção mais adequado para a eficiência e segurança dos processos, sob o ponto de vista ecotoxicológico e microbiológico;
- Comparar qual dos tratamentos (ozonização ou UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é mais efetivo na redução da carga microbiológica potencialmente patogênica, bem como na diminuição dos efeitos tóxicos do efluente secundário;
- Verificar a influência da sazonalidade na toxicidade das amostras de efluentes antes e após aplicação dos POA.
- Verificar se os processos oxidativos avançados aqui estudados se caracterizam em uma metodologia eficiente e segura para a saúde humana e ambiental.

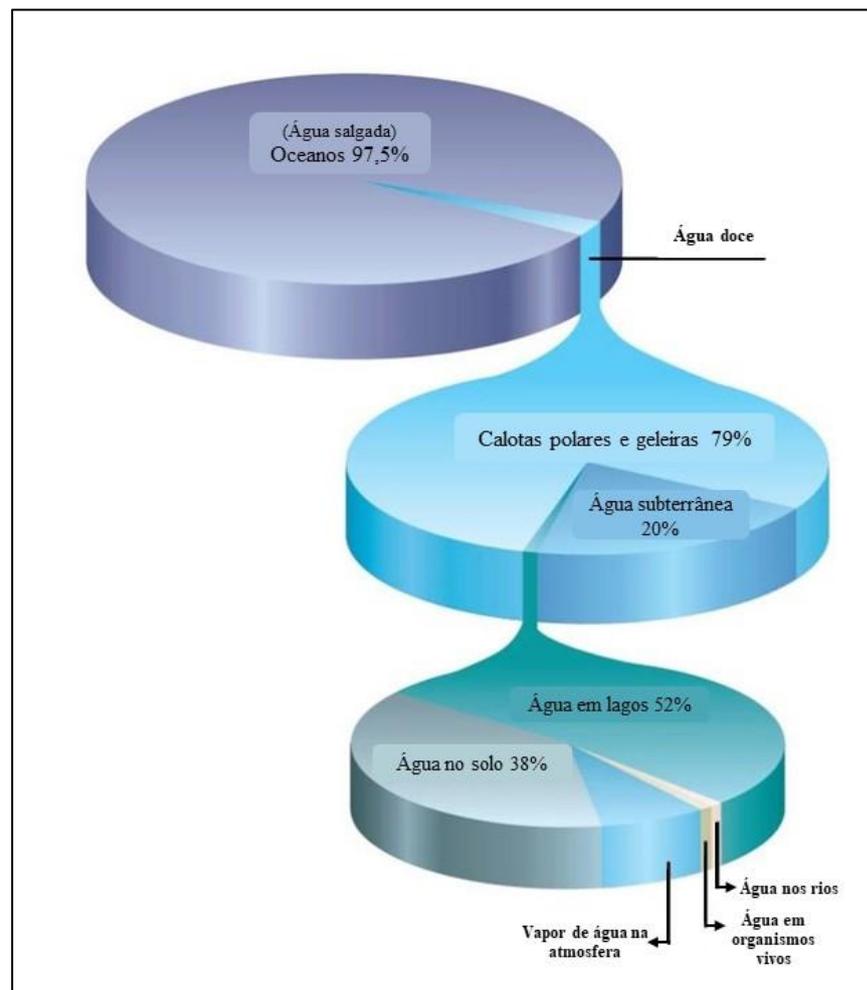
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1 Disponibilidade, uso e poluição de recursos hídricos

A água é um recurso natural essencial para a manutenção da vida. O planeta Terra é constituído de 2/3 de água, sendo que, dessa fração hídrica, 97% são águas dos oceanos e mares e apenas 3% é água doce (Figura 1). Desse percentual de água doce existente, a maior parte está localizada nas calotas polares, geleiras e icebergs, restando apenas cerca de 0,3% de água doce disponível para uso dos seres vivos, sendo os rios a principal fonte de abastecimento de água renovável para os humanos e para os ecossistemas dulcícolas (UNESCO, 2009; VÖRÖSMARTY et al,2005).

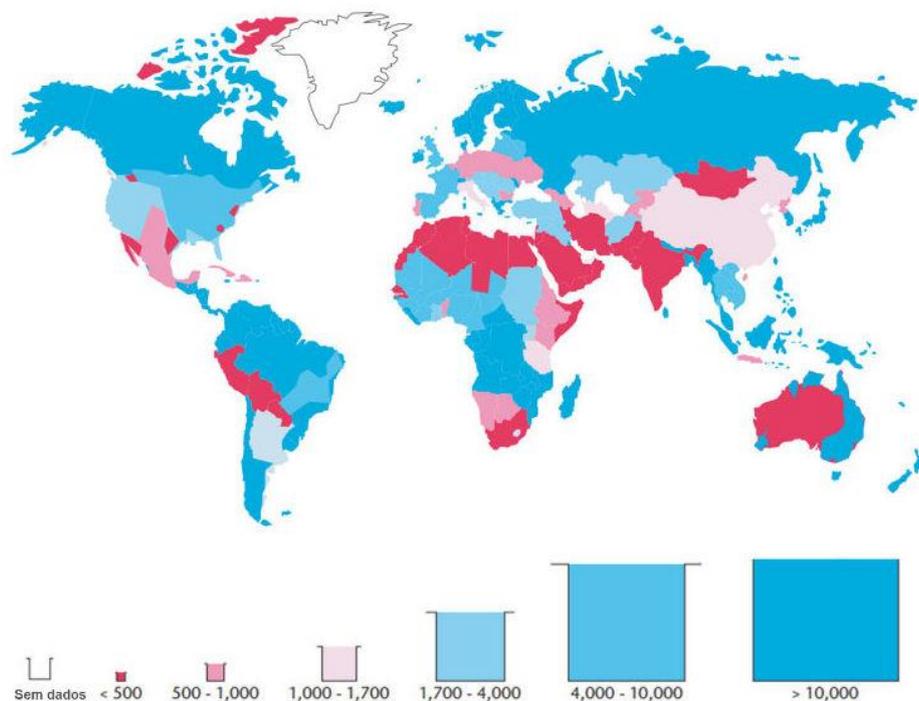
**Figura 1-** Distribuição global de água.



Fonte: adaptado de Wayman 2015.

Em termos globais, o Brasil possui cerca de 12% da disponibilidade de água doce do planeta. Apesar desta abundância, seus recursos hídricos não são inesgotáveis e a distribuição natural desse recurso não é equilibrada (MMA, 2016). A região Norte concentra cerca de 80% do total de água disponível, mas apresenta apenas 5% da população brasileira. Já, as regiões próximas ao Oceano Atlântico, concentram mais de 45% da população, porém com menos de 3% dos recursos hídricos do país (ANA, 2018). Essa mesma distribuição desigual da água doce pode ser observada em várias partes do mundo (Figura 2).

**Figura 2:** Índice de disponibilidade de água per capita ( $\text{m}^3/\text{pessoa}/\text{ano}$ ).



Fonte: UNESCO - UNWater, 2006.

De acordo com o Fórum Econômico Mundial, as crises hídricas têm se destacado como um dos cinco principais impactos sobre o Planeta (WEF, 2019). As mudanças climáticas são um dos fatores responsáveis pela crise hídrica. As projeções do clima indicam que eventos extremos de precipitação se tornarão mais frequentes em algumas regiões, assim como as ondas de calor poderão durar mais tempo, resultando em secas mais intensas (TRENBERTH et al., 2014). As mudanças na temperatura global afetarão o balanço hídrico terrestre (SCHEWE et al., 2014), o que pode levar a diminuição da disponibilidade hídrica sazonalmente e, conseqüentemente, afetar a quantidade de água para agricultura, abastecimento industrial e

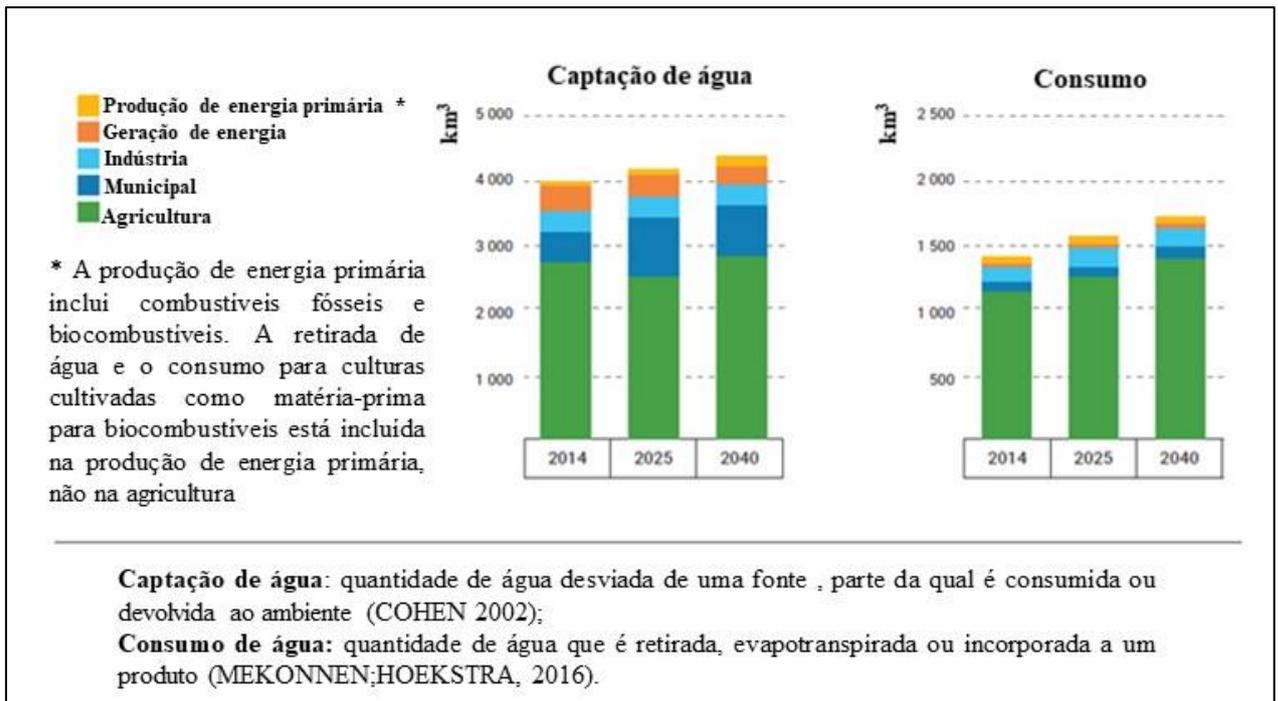
doméstico, bem como geração de energia, navegação, pesca, lazer, sem contar com as perdas ambientais (UNESCO, 2020).

O consumo de água tem crescido, no último século, mais que o dobro da taxa de aumento populacional (FAO, 2013). De acordo com a World Meters (2021), a taxa de crescimento populacional de 2020 foi de 1,05. Esse aumento é resultado do crescimento populacional, desenvolvimento socioeconômico e evolução de padrões de consumo (WWAP, 2016). Burek et al. (2016), alertam que a demanda global de água deve continuar aumentando em taxa similar até 2050. Grande parte do aumento dessa demanda será impulsionado pela agricultura, que hoje já corresponde a cerca de 70% do uso global de água doce. As indústrias ocupam a segunda posição neste ranking (cerca de 19%), seguido de outros tipos de consumo humano, como o doméstico (11%) (UNESCO, 2003; WRI, 2020; AQUASTAT, n.d). A Figura 3 apresenta uma projeção da demanda global de água, por setor, até 2040. Esse aumento pode resultar em graves crises de abastecimento, não somente pela quantidade de água disponível, mas também pela qualidade da água disponível para consumo.

Os sistemas aquáticos também são transformados por mudanças generalizadas na cobertura do solo, pela urbanização, industrialização e obras de engenharia como reservatórios, irrigação e transferências entre bacias que visam maximizar o acesso humano à água (MEYBECK, 2003). Essas alterações no meio influenciam na qualidade da água e afetam, não só a economia e bem-estar social, mas a sustentabilidade de fluxos ambientais vitais, os ecossistemas e a biodiversidade (WWAP, 2017).

A irrigação intensa de áreas agricultáveis, a liberação descontrolada de pesticidas e produtos químicos em cursos d'água, somada a ausência de tratamento de esgoto, são provas da falta de gerenciamento sustentável dos recursos hídricos (UNESCO, 2015). Isso tudo tem comprometido a qualidade das águas, causando um sério problema mundial, de ordem ambiental e de saúde pública.

**Figura 3-** Demanda global de água por setor (projeção até 2040).



Fonte: Adaptado do Relatório da UNESCO (2019).

A União Europeia já registrou mais de 100.000 químicos derivados de produtos desenvolvidos pelo homem, dos quais 30.000 a 70.000 são de uso rotineiro (LOOS et al. 2009). Por essa razão, estima-se que uma grande parte deles atinja os sistemas aquáticos, juntamente com um número considerável de produtos de sua transformação e subprodutos de misturas complexas (BRACK et al., 2017). Nos últimos anos, algumas substâncias orgânicas traços, como resíduos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, pesticidas emergentes e produtos químicos industriais, foram detectadas no ambiente aquático, das quais muitas foram ou estão sendo estudadas, quanto aos seus efeitos biológicos (BLUM et al., 2017; YANG et al., 2017; MIKLOS et al., 2018).

Os locais de alta densidade demográfica são os que mais apresentam agentes químicos que comprometem a qualidade dos recursos hídricos, como, por exemplo, os contaminantes presentes nas águas residuais (MARIA et al., 2007; PEDROZA et al., 2010; COORS et al., 2018). As águas residuais são todas as águas descartadas, após uso em atividades humanas. Essas águas podem ter diversas origens, como a doméstica, que serviram as instalações residenciais, e as industriais, que serviram as indústrias. Existe ainda as águas residuais mistas, que são derivadas da mistura das águas servidas em atividades urbanas, industriais e/ou pluviais (BRASIL, 1997). Portanto, as águas residuais podem apresentar características bastante

diversas, por conterem diferentes substâncias, como material suspenso, compostos orgânicos, metais, entre outros (ARCHELA et al., 2003), derivadas das próprias atividades regionais e dos processos em que foram geradas. Assim, para evitar que essas águas sejam liberadas *in natura* nos corpos hídricos e deteriore o meio aquático, elas devem passar por processos de tratamentos, realizados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE).

### 3.2 Tratamento de Esgoto

O estabelecimento das primeiras ETEs, há mais de 100 anos, foi impulsionado pelos surtos de algumas doenças, como a cólera e a febre tifoide, que eram transmitidas por águas contaminadas com patógenos, advindos de águas residuais. Já os estágios de remoção de nutrientes foram instalados nas ETEs somente nas décadas de 60 e 70, após o conhecimento de que uma das principais causas da eutrofização das águas superficiais era a presença de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, nos efluentes (PRASSE et al., 2015). Hoje, as ETEs são responsáveis pela remoção de poluentes das águas residuais e pela diminuição significativa da carga poluidora orgânica, inorgânica e microbiológica do esgoto (CARVALHO; OLIVEIRA, 2010). Ao longo do tempo, as ETEs passaram por algumas transformações, que resultaram em uma melhora considerável na qualidade do efluente lançado nos recursos hídricos (IGERE et al., 2020).

Os tratamentos convencionais (físicos e biológicos) realizados pelas ETEs removem apenas parcialmente as substâncias orgânicas traços (LIM, 2008; LUO et al., 2014). Dentre essas substâncias, destacam-se os micropoluentes, também denominados de contaminantes emergentes, que incluem, por exemplo, produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, hormônios esteroides, produtos químicos industriais, pesticidas, entre outros (LUO et al., 2014). Além disso, há um novo desafio a ser vencido pelos tratamentos realizados em ETEs, que é o de impedir a proliferação de bactérias e genes resistentes a antibióticos (IGERE et al., 2020).

No Brasil, são gerados diariamente 9,1 toneladas de esgoto, sendo 3,9 mil t encaminhadas para tratamento coletivo; 1,7 mil t coletadas, mas não submetidas a tratamento; 1,1 mil t encaminhadas para fossas sépticas e 2,4 mil t despejadas a céu aberto (Atlas Esgotos – ANA, 2017). De acordo com os dados do Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento (SNIS), em 2018, 53,2% da população possuía acesso à coleta de esgoto e apenas 46,3% da população tinha seu esgoto tratado. Sendo, 70% dos 5.570 municípios brasileiros possuíam remoção inferior à 30% da carga orgânica gerada e apenas 31 dos 100 municípios mais populosos do Brasil possuíam remoção de carga orgânica acima de 60% (ANA, 2017). O Estado

de São Paulo destaca-se no cenário nacional, por apresentar 87% das ETEs com eficiência média dos processos de tratamento de esgoto.

As águas residuais coletadas em sistemas urbanos são encaminhadas às ETEs, onde passam por diferentes etapas de tratamento, referenciadas como primária, secundária ou terciária, nomenclaturas estas que definem o desempenho das ETEs, quanto à remoção dos poluentes presentes nos efluentes brutos. De maneira geral, a etapa inicial, também chamada de pré-tratamento, é feita por grades ou peneiras rotativas, estáticas ou trituradores, que removem os sólidos grosseiros e areias presentes nos efluentes. Os grãos de areia são removidos, por decantação, em desarenadores, onde a areia se deposita no fundo do tanque e a matéria orgânica permanece em suspensão. Após esse processo, inicia-se o tratamento primário, no qual o efluente segue para o decantador primário, para a sedimentação das partículas mais pesadas e a consequente formação do lodo primário. Na sequência, o efluente é direcionado para o tratamento secundário, para a remoção da matéria orgânica em suspensão. Essa etapa é realizada por diversos mecanismos, sendo as lagoas de estabilização ou tanque de aeração os mais usados. Nesses locais ocorre a multiplicação de microrganismos endêmicos, a geração de mais lodo (lodo secundário ou biológico) e a diminuição da carga orgânica do efluente. Em algumas ETEs, o efluente tratado é lançado no corpo d'água receptor, após o tratamento secundário. Contudo, muitos estudos demonstram uma remoção incompleta de micropoluentes e uma toxicidade relevante, após os tratamentos secundários convencionais das águas residuais (PRASSE et al., 2015). Por essa razão, algumas estações de tratamento também realizam o tratamento terciário. Esta etapa, que é usada em casos específicos, tem como objetivo remover poluentes tóxicos e compostos recalcitrantes, que não foram removidos nas etapas anteriores, bem como a desinfecção do efluente, por tratamentos químicos ou físicos como, como por exemplo, adsorção por carvão ativado; microfiltração pelo uso de membranas; cloração; uso de processos oxidativos avançadas como ozonização, entre outros (JESUS et al., 2017; SABESP, 2018).

Dentre todas as etapas do tratamento de esgoto, o processo de desinfecção é reconhecido como um dos mais importantes. Nesta etapa, ocorre a inativação, por agentes químicos, de microrganismos patogênicos presentes no efluente, o que leva a uma diminuição do risco de disseminação de doenças de veiculação hídrica (COSTA, 2007) e uma maior proteção ao meio ambiente e à saúde pública. A presença de patógenos na água também tem consequências sobre a economia, pois a água contaminada pode reduzir a produtividade e a expectativa de vida da população exposta, bem como aumentar os gastos com saúde pública (JORDÃO; PESSOA, 2009). Para a desinfecção dos efluentes, os principais agentes químicos convencionalmente

utilizados são o cloro, o permanganato de potássio e o ácido peracético (DANIEL, 2001). Apesar do cloro ser caracterizado como um agente desinfetante de baixo custo, alguns estudos demonstram que a sua utilização não tem sido eficiente na eliminação de giárdia, *Cryptosporidium* e alguns vírus (ASSIRATI, 2005). Além disso, é necessário, após o uso do cloro na desinfecção do efluente, a descloração do efluente, antes do mesmo ser lançado no corpo d'água receptor, pois o cloro residual pode causar danos à biota aquática (GONÇALVES, 2003). Por esta razão, vêm se destacando métodos alternativos para tratamentos sanitários como, por exemplo, os processos de oxidação avançada. Esse processo também tem mostrado ser promissor para a remoção de compostos orgânicos traços e não biodegradáveis (MIKLOS et al., 2018).

Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2014), frente à intensa deterioração dos recursos hídricos pela poluição, bem como pela gradativa e intensa redução dos índices pluviométricos em algumas regiões do país, principalmente no semiárido brasileiro e nas regiões metropolitanas de São Paulo e Rio de Janeiro, devem ser fomentadas técnicas de reuso da água, redução de desperdícios, implementações da conservação de mananciais e desenvolvimento de tecnologias seguras e mais efetivas no tratamento de esgoto, que garantam o fornecimento de água de qualidade para seus mais diversos usos. Assim, vem sendo cada vez mais indicada a utilização de processos de desinfecção de efluentes finais de ETE, que garantam a qualidade final dos mesmos e, conseqüentemente, evitem prejuízos ambientais, econômicos e de saúde pública (CAVALLIN et al., 2012). Neste contexto, a proposta de reutilização desses efluentes tratados vem sendo amplamente discutida e cada vez mais aceita no cenário nacional.

### **3.3 Reuso da água e os processos oxidativos avançados**

Segundo a SABESP (2015), o reuso da água consiste na sua utilização, por mais de uma vez, após um tratamento adequado. O reuso da água recebe três qualificações: 1. o reuso indireto não planejado, quando a água já utilizada é descarregada no meio ambiente, sendo diluída nos corpos hídricos receptores e, assim, novamente utilizada; 2. o reuso indireto planejado, que ocorre quando os efluentes são devidamente tratados e descarregados, de forma planejada e controlada, nos cursos d'água e integrados à jusante; 3. o reuso direto planejado, que consiste no tratamento dos efluentes e o seu encaminhamento ao local específico que será reutilizado (PÁDUA, 2011). O reuso planejado da água faz parte de um programa global recomendado pela Organização das Nações Unidas (ONU) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que

pretende alcançar três importantes elementos: proteção à saúde pública; manutenção da integridade dos ecossistemas e uso sustentável da água.

O reuso de efluentes se apresenta como uma importante ferramenta de uso racional da água, no âmbito da gestão de recursos hídricos. Essa prática, além de mitigar os impactos que os efluentes possam promover no meio ambiente, reduz a captação de água dos mananciais, permitindo maior disponibilidade hídrica para os mais diversos fins (SANTOS et al., 2018). O reuso de efluentes de ETEs é uma prática empregada mundialmente para minimizar o estresse hídrico. Países da região do mediterrâneo, do oriente médio, da Oceania e da América Central, que enfrentam graves problemas de escassez de água para abastecimento público, vem adotando o reuso de efluentes para fins menos nobres, o que tem levado a um aumento da disponibilidade hídrica das bacias hidrográficas dessas regiões (SILVA et al., 2016).

Apesar do aumento geral de investimento em políticas públicas e de regulamentação para o reuso, em muitos países esse controle ainda é incipiente. Os Estados Unidos foi o primeiro país a organizar e legislar sobre o reuso do esgoto na agricultura. Posteriormente, a legislação expandiu sua regulamentação para o reuso industrial e urbano. A OMS regulamentou, a partir da década de 1970, diretrizes para a utilização de águas residuais, estabelecendo, para cada tipo de reuso, parâmetros específicos a serem seguidos. Por exemplo, a USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) exige, para uso irrestrito na irrigação, um padrão de qualidade de efluentes semelhante ao padrão de potabilidade da água para consumo humano (ausência de coliformes e padrões estritamente definidos para turbidez e cloro residual), o que somente é alcançado com processos rigorosos de tratamento (USEPA, 2004). Já, para irrigação restrita (culturas alimentícias processadas e culturas não alimentícias) há uma maior tolerância em termos bacteriológicos. Há ainda, os padrões definidos para o reuso das águas residuais em ambientes urbanos e industriais, que levam em consideração o grau de exposição do ser humano à água de reuso (USEPA, 2004).

Embora haja, conforme já mencionado, muitos benefícios no reuso de água, é necessária muita cautela em se instituir essa prática, pois o reaproveitamento de águas residuais pode envolver riscos à saúde e ao meio ambiente. A reutilização das águas residuais é considerada um elemento crítico da gestão sustentável da água. A matéria orgânica dissolvida no efluente e presente nas águas residuais urbanas biologicamente tratadas, consiste de uma mistura heterogênea de compostos orgânicos com estruturas diversas e origens variadas, que incluem a matéria orgânica dissolvida, produtos microbianos solúveis, alteradores endócrinos, produtos farmacêuticos, resíduos de produtos de cuidados pessoais, subprodutos da desinfecção, entre

outros que podem atingir o ambiente aquático pelo descarte e pela reutilização das águas residuais (MICHAEL-KORDATOU et al., 2015).

A qualidade dos efluentes gerados nas ETEs depende da tecnologia adotada nessas estações. Para que a água de reuso possa ser usada com segurança, é necessário que as estações de tratamento utilizem metodologias eficazes de remoção de contaminantes dos efluentes gerados. Uma prática muito eficiente no tratamento de águas residuais é a realização do tratamento terciário (MENESES et al., 2010), pois esse tipo de tratamento produz efluentes de melhor qualidade que os provenientes de etapas primárias e secundárias (SANTOS et al., 2018). Países como Reino Unido e a Itália reaproveitam os efluentes de ETEs na agricultura, após as águas residuárias passarem por tratamento terciário (CAVALLIN et al., 2012).

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) vêm sendo utilizados como alternativas aos processos convencionais de tratamento de efluentes, pois cada vez mais as águas residuárias vêm exibindo maior complexidade e, assim, maior dificuldade de tratamento (MELO et al., 2009, BRITO et al., 2011). Os POAs são eficazes na remoção de microcontaminantes e microrganismos para a desinfecção de águas residuais (LOEB et al., 2012; MALVESTITI; DANTAS, 2018; YASAR et al., 2007). Essa técnica baseia-se na geração de radicais hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), que são altamente reativos, não seletivos e, portanto, capazes de oxidar e decompor uma vasta gama de substâncias tóxicas e/ou recalcitrantes (DANTAS et al., 2009; PIGNATELLO et al., 2006; RIZZO, 2011; TIBURTIUS et al., 2005). De maneira geral, o radical hidroxila oxida a espécie orgânica por abstração de hidrogênio, originando o radical orgânico ( $\text{RO}\bullet$ ), que, posteriormente, pela adição de oxigênio, forma o radical orgânico peróxido. Este leva a reações em cadeias gerando radicais mais oxidados. Após sucessivas etapas, esse processo pode transformar, parcial ou totalmente, os poluentes em espécies mais simples como dióxido de carbono, água, ânions inorgânicos ou substâncias menos tóxicas. No entanto, dependendo da composição do efluente e do grau de oxidação das moléculas, os produtos de degradação podem ser mais tóxicos e menos biodegradáveis que os originais (PIGNATELLO et al., 2006).

Estudos realizados por Etchepare et al. (2014) apontam que os processos oxidativos são eficientes para a desinfecção de efluentes urbanos, pois inativam até os organismos mais resistentes, como a *Escherichia coli*. Gogate e Pandit (2004) destacam que os radicais hidroxilas podem modificar a estrutura química de compostos orgânicos persistentes, tornando-os mais simples, de menor massa molar, menos tóxicos aos microrganismos e, conseqüentemente, mais biodegradáveis.

Os POAs podem ser empregados em tratamentos de águas residuais que passaram apenas por tratamento biológico. Isto porque, o processo de tratamento oxidativo se caracteriza

em uma alternativa interessante para a substituição do uso de desinfetantes químicos convencionais. Esse processo melhora a qualidade do efluente de ETEs, devido a possível remoção de xenobióticos residuais, o que leva a uma diminuição da toxicidade final do efluente e, conseqüentemente, a possibilidade de uma maior segurança no reuso da água tratada (MIKLOS et al., 2018).

Um POA muito utilizado em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, é a desinfecção realizada pela radiação UV-C. Esse processo apresenta alto poder de desinfecção, que pode ser ainda aumentado quando combinado com  $H_2O_2$  (YANG et al., 2014). O  $H_2O_2$  é diretamente ativado pela luz UV, formando dois radicais  $HO\bullet$ . Isso ocorre pois o  $H_2O_2$  pode ser fotolisado pela irradiação UV (comprimento de onda de 200 a 300 nm), ocasionando a quebra da ligação O-O da molécula de  $H_2O_2$  gerando radicais hidroxila ( $H_2O_2 + \text{radiação UV} \rightarrow 2 HO\bullet$ ) que agem na degradação de espécies orgânicas (HERNANDEZ et al., 2002). A radiação UV, dependendo do tempo da exposição e da dose utilizada, inativa os patógenos pela alteração do DNA e RNA desses organismos. Uma alta dose de UV pode danificar a membrana celular, levando a célula à morte (BRAUNSTEIN et al., 1996). A atividade antimicrobiana do peróxido de hidrogênio está relacionada à geração de radicais, como o oxigênio singlet, o superóxido, e os radicais hidroxila. Esses agentes oxidantes são extremamente reativos e causam danos permanentes aos componentes celulares, tais como as enzimas, os componentes da membrana e os ácidos nucléicos (KSIBI, 2006). Por esta razão, este POA é muito aplicado em tratamentos de efluentes com fins de reuso, no tratamento avançado para desinfecção e extração de contaminantes de água potável e para remover sabor e odores da água (MIKLOS et al., 2018).

Outro processo que tem se mostrado muito eficiente na desinfecção é a ozonização. O ozônio é um eficiente bactericida, aplicado há muitos anos como desinfetante por muitos países (DOMÉNECH, 2001; CHIELLINI et al., 2014). A ozonização destrói os patógenos por oxidação lipídica e/ou por danos nas bases nitrogenadas dos ácidos nucléicos (GEHR et al., 2003). Esse processo é bastante efetivo na inativação de bactérias coliformes, vírus, colifagos, cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* (COSTA; DANIEL, 2002). Além disso, o ozônio também contribui para um aumento da concentração de oxigênio na água, redução da matéria orgânica e oxidação da amônia (BROSEUS et al., 2009; SILVA et al., 2010). A degradação de contaminantes orgânicos por ozônio está relacionada com a reação direta do  $O_3$  molecular ou por meio da formação de radicais livres, como o radical hidroxila ( $HO\bullet$ ), que é menos seletivo que o  $O_3$  molecular (ACERO; GUNTEN, 2001).

Em processos oxidativos avançados, a composição e variação química de um dado efluente pode influenciar, diretamente, na produção de radicais livres e prejudicar a desinfecção

do mesmo (GONZALES et al., 2012). Assim, quando um processo oxidativo se mostra ineficiente na remoção de um determinado tipo de contaminante, ou apresenta baixo poder de desinfecção, uma proposta interessante a ser aplicada seria a combinação de processos diferentes, que possam otimizar a eficiência do tratamento realizado. A combinação da ozonização com UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produz maiores quantidades de radicais livres no sistema, podendo se caracterizar em uma estratégia mais adequada para a desinfecção (DUDZIAK; BURDZIK, 2014; QIN et al., 2015; PUSPITA et al., 2015), pois nem todas as substâncias são reativas ao ozônio (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991). Entretanto, como já discutido anteriormente, quando se aplica processos oxidativos avançados, há uma preocupação adicional com a formação de compostos ainda mais tóxicos, em decorrência da oxidação e transformação dos compostos orgânicos (LUO et al., 2014). Por esta razão, deve-se avaliar, cautelosamente, os subprodutos formados e a toxicidade do sistema, durante o processo de oxidação, para assegurar o nível de efetividade do tratamento (SAI; TAO, 2013).

Adicionalmente, como os agentes desinfetantes têm a capacidade de induzir interações químicas nocivas na comunidade microbiana, é necessário confirmar se os danos estão restritos apenas aos microrganismos presentes no efluente (COSTA, 2007). De acordo com Monarca et al. (2000), vários estudos mostram que os desinfetantes podem reagir com substâncias orgânicas naturalmente presentes nos efluentes domésticos e águas superficiais, formando subprodutos com atividade mutagênica e/ou carcinogênica. No entanto, os efeitos tóxicos podem ser causados não apenas pelos subprodutos da desinfecção, mas também por substâncias residuais dos próprios agentes de desinfecção (COSTA, 2007). Com isso, deve-se levar em consideração, não somente o poder desinfetante de determinados agentes, mas também os impactos ambientais que os mesmos podem causar.

### **3.4 Diretrizes normativas de reuso e o monitoramento de microrganismos patogênicos**

As doenças transmitidas pela água representam ameaças graves à sociedade, devido ao seu potencial de infectar muitos indivíduos (MARA; HORAN, 2003). Estudos mostram que as ETEs são um reservatório para crescimento de uma variedade de bactérias patogênicas (CAI; ZHANG, 2013; OKOH et al., 2007). Por esta razão, têm sido usados, tradicionalmente, indicadores bacterianos e outros agentes biológicos para avaliar a eficácia dos sistemas de tratamento de água e esgoto na inativação de microrganismos. A caracterização microbiológica das águas residuais concentra-se, principalmente, na presença, em potencial, de patógenos e parasitas humanos, já que seria impraticável a realização de testes para identificação de cada

um dos possíveis patógenos presentes nas águas (MARA; HORAN, 2003). A análise é geralmente baseada na identificação de indicadores fecais e ovos de nematoides, mas pode variar de acordo com as diretrizes estabelecidas por cada país e/ou região (BECERRA-CASTRO et al., 2015).

As águas residuais tratadas podem ser destinadas para usos na agricultura, nas cidades para fins não potáveis, para lazer, no paisagismo, entre outros (SALGOT; FOLCH, 2018). Contudo, a sua aplicação deve seguir regulamentação específica, para que uma água tratada de maneira inadequada não seja utilizada em atividades que possam colocar em risco a saúde da população (DICKIN et al., 2016). A maioria das diretrizes internacionais de água de reuso baseiam-se nas diretrizes do Estado da Califórnia (STATE OF CALIFORNIA, 1978) e nas diretrizes da OMS (WHO, 1989).

De acordo com Licciardello et al., 2018, as diretrizes da Califórnia apresentam ‘risco zero’ com relação aos microrganismos, pois estão baseadas em premissas de que microrganismos patogênicos podem sobreviver por dias, semanas e as vezes por meses no solo e nas culturas, podendo causar problemas de saúde pública. Já as diretrizes da OMS seguem uma abordagem de ‘risco calculado’ com base em evidências epidemiológicas. Essas diretrizes recomendam limites de *Escherichia coli*, dependendo do tipo de uso (WHO, 2006). No Brasil, ainda não há um instrumento legal a nível nacional, que defina parâmetros de qualidade de água para o reuso de efluentes. Na esfera nacional, há somente aspectos normativos norteadores para isso, que são: a Norma ABNT NBR 1369/97, que classifica o grau de qualidade necessário para cada tipo de reuso; a Resolução nº54 (28/11/05) do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), que estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais do reuso direto não potável; e a Resolução nº 121 (2010) do CNRH, que prescreveu diretrizes e critérios para a prática do reuso direto não potável na modalidade agrícola e florestal. Além disso, o Brasil tem também normas e diretrizes estaduais e/ou municipais que tratam desse mesmo tema.

Todas essas diretrizes, do ponto de vista bacteriológico, trazem limites para os coliformes termotolerantes e/ou *E. coli*. Os coliformes termotolerantes são um subgrupo de coliformes constituídos, em sua maior parte, pela *E. coli*, mas também incluem espécies de outros gêneros, como *Klebsiella* e *Enterobacter*. Esse grupo estabelece uma correlação direta da poluição por fezes de animais de sangue quente, onde a principal característica bioquímica utilizada para detectar a presença deles é a sua capacidade de fermentar a lactose, com produção de gás, na temperatura de 44,5 °C (GELDREICH, 1974; MARA; HORAN, 2003). No entanto, outras bactérias patogênicas podem estar presentes nas águas residuais e também, acarretarem riscos à saúde humana e ambiental. Dessa forma, é muito importante uma análise mais

detalhada das bactérias patogênicas presentes em águas de reuso. Nesta perspectiva, há então a necessidade de uma pesquisa aprofundada sobre o movimento e o comportamento de microrganismos em águas residuais, pois existem ainda uma grande lacuna, quanto a compreensão de todos os parâmetros envolvidos com a sobrevivência e persistência de diferentes tipos de microrganismos patogênicos nas águas residuais (OKOH et al., 2007).

Os efluentes de águas residuais contêm ainda diversas substâncias, incluindo antibióticos, biocidas e metais (JU et al. 2019), que podem gerar cepas de microrganismos resistentes no sistema. Por isso, as ETEs são apontadas como *hotspots* para disseminação da resistência bacteriana no meio ambiente (GALLERT et al., 2005; JU et al. 2019; MICHAEL et al., 2013). Um estudo realizado por Ternes et al. (2017) avaliou os efluentes de esgoto, antes e após tratamento avançado. Os autores observaram a presença de bactérias resistentes a antibióticos, mesmo após o tratamento.

Outro ponto importante é que os ecossistemas edáficos e aquáticos apresentam comunidades bacterianas endêmicas da região, que podem ser afetadas pela água descartada das ETEs, bem como pelo reuso desses efluentes. Os efluentes contêm bactérias de origem humana e animal capazes de interagir com as comunidades bacterianas naturais (por exemplo de rios, lagos ou solo) de maneiras imprevisíveis (NUMBERGER et al., 2019). Portanto, a identificação dos microrganismos presentes nos efluentes finais são importantes ferramentas para estimativas de possíveis riscos ambientais e sanitários, além de verificar a eficiência dos processos de tratamento aplicados.

Uma outra preocupação, levantada pela comunidade científica sobre o reuso da água, são os riscos químicos devido à infinidade de produtos orgânicos que possam persistir nas águas residuais tratadas. Embora, internacionalmente, muitos regulamentos e diretrizes para reutilização tenham sido implementados, há dúvidas se o conhecimento atual sobre os riscos químicos é considerado suficiente no contexto regulatório (HELMECKE; FRIES; SCHULTE, 2020). Os riscos resultantes da exposição a patógenos, impactos de nutrientes, metais pesados e salinidade são mais abordados em documentos e regulamentos (WHO, 2006; DWA, 2019), no entanto, os riscos químicos com relação aos microcontaminantes orgânicos não são tão discutidos (HELMECKE; FRIES; SCHULTE, 2020). Atualmente, a União Europeia está se esforçando para identificar indicadores químicos e de toxicidade para o controle e redução de riscos ambientais e para a saúde humana relacionados aos microcontaminantes (HELMECKE; FRIES; SCHULTE, 2020). O projeto colaborativo europeu “*SOLUTIONS*” sugere que para abordar os efeitos de misturas complexas na água, há a necessidade de implementação de

métodos baseados em efeitos complementares às análises químicas dos contaminantes (BRACK et al., 2019).

Dessa forma, uma legislação para reuso de água deve vir acompanhada de uma estrutura que auxilie o estabelecimento de um sistema de monitoramento significativo para os contaminantes, permitindo validar o desempenho dos processos de tratamento. Embora exista uma variedade de critérios para reutilização da água, falta uma padronização dos parâmetros exigidos mundialmente. Dessa forma, é necessário um esforço para obter maior consistência entre as diferentes regulamentações e diretrizes internacionais, de modo que estes possam garantir, simultaneamente, o reuso da água e a proteção do ambiente (ANGELAKIS et al., 2018).

### **3.5 Monitoramento biológico: uma importante ferramenta para avaliação de ecotoxicidade**

Os bioensaios constituem ferramentas importantes para monitorar a eficácia de tratamentos de efluentes (MAGDEBURG et al., 2012; PRASSE et al., 2015), já que as análises químicas de amostras ambientais estimam somente a presença e a concentração de elementos e substâncias tóxicas no sistema, não refletindo a real biodisponibilidade dos mesmos (CESAR et al., 2008). Dessa forma, os testes de toxicidade complementam os dados químicos, pois fornecem respostas mais abrangentes das características da amostra, como efeitos interativos e biodisponibilidade dos compostos ali presentes (MELO et al., 2009), além das reações dos organismos aos poluentes ambientais (MORAES, 2000). Segundo Escher et al. (2008), o uso de uma bateria de bioensaios *in vitro*, baseados em diferentes modos de ação, caracteriza-se em uma ferramenta útil para monitorar a eficiência de tratamentos de esgotos.

#### **3.5.1 Ensaios *in vivo* com o bioindicador *Lactuca sativa***

Ensaios *in vivo* realizados com alface (*Lactuca sativa*) permitem avaliar a fitotoxicidade de compostos químicos e de amostras ambientais, como solo, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas. As principais vantagens do uso deste organismo-teste são a rápida germinação, baixo custo, simplicidade e reprodutibilidade do teste, além da necessidade de pequenos volumes de amostras para os ensaios (PRIAC; PIERRE-MARIE; CRINI, 2017).

Além da germinação, também pode ser avaliado nos testes realizados com *L. sativa* o

crescimento das estruturas da raiz (hipocótilo e radícula) (CAPAGNA-FERNANDES; MARIN; PENHA, 2016; PRIAC; PIERRE-MARIE; CRINI, 2017; QURESHI; ARSHAD; BIBI, 2014;). Em alguns casos, compostos solúveis em concentrações baixas não afetam a germinação, mas podem inibir o alongamento da radícula ou do hipocótilo. Dessa forma, esses parâmetros constituem um biomarcador complementar importante para a avaliação de efeito fitotóxico de contaminantes (SOBRERO; RONCO, 2004).

### 3.5.2 Ensaios *in vitro* com células humanas

O cultivo de células humanas tem sido empregado em muitos estudos de monitoramento ambiental, por apresentarem uma alta sensibilidade a contaminantes (LEME et al., 2011; LIU et al., 2012; SOMMAGGIO et al., 2018) e uma boa correlação com os efeitos observados em teste com humanos (BRUSICK, 1987). A cultura de células é considerada um eficiente sistema-teste para ser aplicado em ensaios que avaliem o potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes (PILLON et al., 2005; WESTERINK et al., 2010; LEME et al., 2011; LIU et al., 2012; RAGAZZO et al., 2017).

Os ensaios do cometa e do micronúcleo (MN) são frequentemente aplicados para detectar alterações no material genético de linhagens de células de mamíferos, sendo ferramentas fundamentais para a avaliação da qualidade da água (PRASSE et al., 2015). Esses ensaios são reconhecidos devido à sua robustez, sensibilidade e poder estatístico para avaliar danos ao material genético nas células expostas, sendo testes indicados para avaliação da genotoxicidade (HEUSER et al., 2008).

O ensaio do cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única (do inglês *single cell gel electrophoresis -SCGE*), foi introduzido por Östling e Johanson (1984), para avaliar efeitos da radiação em células de mamíferos. A versão alcalina desse ensaio, desenvolvido por Singh et al. (1988), permite a denaturação do DNA e a consequente detecção de sítios álcali-lábeis, o que tornou essa técnica muito usada e recomendada para avaliar um amplo espectro de danos neste material genético (COLLINS et al., 2008; HARTMANN et al., 2003; SINGH et al., 1988). Este teste permite detectar tanto quebras de fita simples quanto duplas no DNA, as quais podem estar associadas a aberrações cromossômicas e/ou instabilidade genômica (PFEIFFER; GOEDECKE; OBE, 2000). Quando vista sob microscópio, as células com DNA danificado têm a aparência de um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (fragmentos de DNA que migraram em direção ao ânodo da cuba de eletroforese (HARTMANN et al., 2003).

Os corpos “Howell-Jolly” foram identificados pela primeira vez no final do século XIX em precursores de hemácias, pelo americano William Howell e o francês Justin Jolly. Essas estruturas foram observadas, posteriormente, em outros tipos celulares (embriões de camundongo e rato, por Brenneke em 1937, e em *Vicia faba*, por Thoday em 1951), e consideradas fragmentos acêntricos expelidos do núcleo principal, em estágios finais da anáfase (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003), sendo então denominadas de micronúcleos (MN). Hoje, o ensaio do MN é baseado na avaliação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não são incorporados nos núcleos filhos, após a divisão celular, cujo dano resulta na produção de um MN fora do núcleo principal (GRISOLIA, 2002; JENSENSEN; RAMEL, 1980;). A técnica do MN é considerada um método confiável de avaliação de danos cromossômicos induzidos por agentes tóxicos. A versão dessa técnica, realizada em células binucleadas, com bloqueio da citocinese, pós tratamento com citocalasina-B, é considerada, por Fenech e Morley (1985), como um método confiável de avaliação de danos cromossômicos induzidos por agentes tóxicos.

Os MNs podem ser formados pelos mecanismos de quebras cromossômicas (clastogênese) ou de desorganização do aparato mitótico (aneugênese) (BONASSI et al., 2007; SAMANTA; DEY, 2012). Os MNs podem ainda ser resultado de amplificação do material genético, onde o excesso de DNA no núcleo pode ser ajustado pela expulsão desse material amplificado, dando origem a MNs (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Outro parâmetro que pode ser analisado no ensaio do MN, são os brotos nucleares, os quais são originados por um mecanismo celular de remoção de DNA amplificado e/ou excesso do mesmo, o que o torna um biomarcador de genes amplificados ou dosagem de gene alterado (FENECH, 2006; FERNANDES et al., 2009), cuja progressão, como descrito anteriormente, podem resultar em MN. A presença de micronúcleos, brotos e pontes nucleoplasmáticas são indicativos de danos cromossômicos ou de instabilidade genética (FENECH, 2007). Por essas estruturas estarem envolvidas com vários efeitos celulares das substâncias tóxicas, o ensaio do MN tem sido amplamente utilizado em estudos de genotoxicidade (OECD, 2016).

O ensaio do MN e cometa detectam diferentes mecanismos de ação de um químico ou amostra ambiental. O primeiro detecta lesões que são passadas em, pelo menos, um ciclo mitótico, enquanto o segundo identifica lesões reparáveis ou locais de sítios alcalinos (GOETHEM, 1997; VRZOC; PETRAS, 1997). Consequentemente, é aconselhável a utilização de ambos os ensaios para a avaliação da genotoxicidade de substâncias (GOETHEM, 1997).

### 3.5.3 Ensaios com leveduras recombinantes

Além dos ensaios para verificação de citotoxicidade e genotoxicidade ambiental, existe hoje uma preocupação em avaliar também substâncias que, embora estejam presentes em concentrações muito baixas, elas estão sendo detectadas frequentemente nas águas residuais. Essas substâncias são denominadas de contaminantes emergentes ou micropoluentes orgânicos.

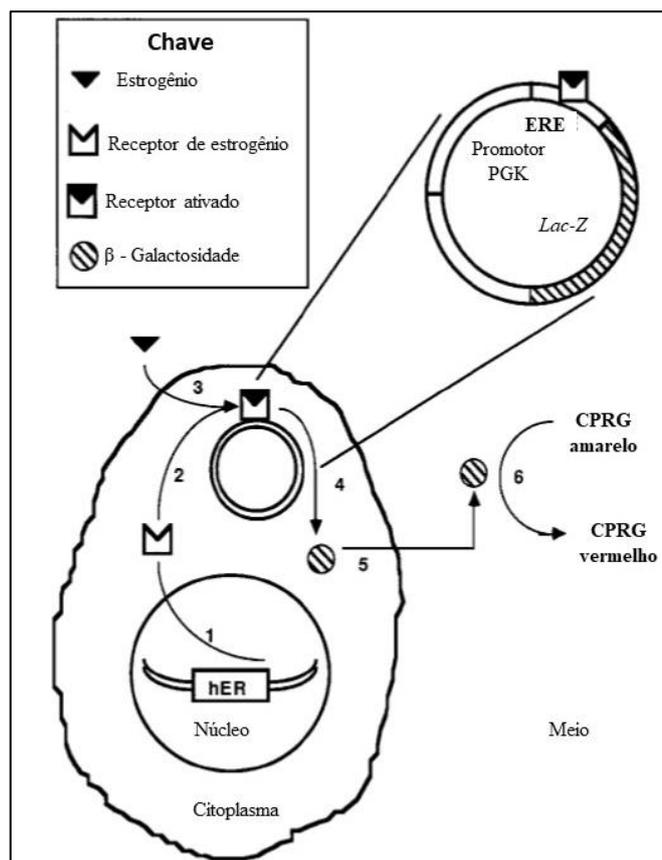
Uma classe desses micropoluentes são os alteradores endócrinos (AEs), que inclui compostos com atividades estrogênicas e androgênicas, os quais são biologicamente ativos em concentrações extremamente baixas (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014), podendo interferir no funcionamento normal do sistema endócrino dos organismos (FATTA-KASSINOS et al., 2011). A presença destes compostos no meio aquático promove um impacto negativo no desenvolvimento populacional de várias espécies, podendo colocá-las em risco de extinção (DZIEWECZYNSKI; HEBERT, 2013; HUMBLE et al., 2013; SILVA et al., 2012). Dentre esses contaminantes, estão as substâncias que apresentam atividades estrogênicas, derivadas principalmente do uso de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (MURK et al., 2002; FERNANDEZ et al., 2009; GIUDICE; YOUNG et al., 2011; BADIA-FABREGAT et al., 2012).

Em um estudo realizado por Brzozowski e colaboradores (1997), foi analisada a estrutura cristalina do receptor de estrogênio humano (hER $\alpha$ ). Os autores observaram que esse domínio é quase duas vezes maior que seu ligante natural (hormônio estrogênio). Tal característica proporciona espaço para uma variedade de moléculas interagir com esse receptor. Logo, pode-se presumir que existam muitos xenobióticos com atividades estrogênicas, que não são identificados por análises químicas, devido à grande variedade de moléculas que podem interagir com o receptor. Desta forma, a utilização de bioensaios específicos para a detecção de compostos estrogênicos permitiu melhor rastreamento dessas substâncias em amostras ambientais, pois esses bioensaios respondem às atividades estrogênicas mediada pela resposta do receptor de estrógeno (KORNER et al., 2001). Ensaios com leveduras recombinantes vêm sendo indicados para a análise de amostras ambientais, pois permitem identificar a presença de contaminantes biologicamente ativos, de forma efetiva e segura (PIÑA et al., 2009; BRIX et al., 2010; MAZZEO et al., 2016).

O método de análise *in vitro* que utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para detectar a presença de compostos com atividade estrogênica foi desenvolvido por Routledge e Sumpter em 1996 (Figura 4). Este método é conhecido pela sigla YES (Yeast Estrogen Screen) e tem sido muito utilizado, devido à sua rapidez,

reprodutibilidade e sensibilidade. A sequência de DNA do receptor de estrogênio humano (REh) foi inserida no genoma da levedura, sob a indução do promotor *Lac-Z*. Com isso, essa levedura torna-se capaz de responder à estrogenicidade de uma amostra, ou seja, avaliar a capacidade das substâncias presentes nesta amostra interagir com o receptor de estrogênio humano e gerar uma resposta que pode ser mensurada pela presença da  $\beta$ -galactosidase (BERESFORD et al., 2000; SILVA; RAJAPAKSE; KORTENKAMP, 2002; PAYNE et al., 2000). A mensuração no ensaio YES é realizada pela reação da  $\beta$ -galactosidase com um substrato colorimétrico ou fluorescente, que é avaliada por espectrofotometria. Os resultados obtidos são comparados aos do padrão 17 $\beta$ -estradiol, sendo expressos em concentração equivalente de 17 $\beta$ -estradiol (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996).

**Figura 4-** Esquema da expressão de estrogênio induzida na levedura, utilizada no ensaio YES.



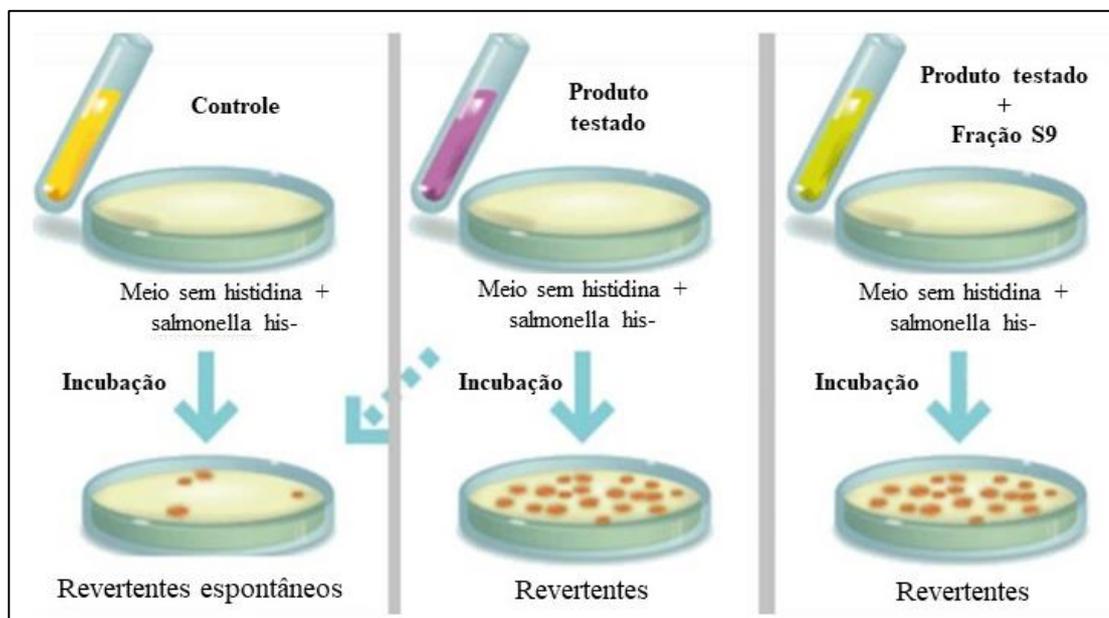
1) Expressão do gene receptor de estrogênio humano (hER), integrado ao genoma principal da levedura, em uma forma capaz de acoplar-se aos elementos de respostas de estrogênios (ERE) localizados no plasmídeo; 2) Ativação do receptor; 3) Ligação do estrogênio ao receptor, causando expressão do gene receptor da Lac-Z; 4) Produção da enzima  $\beta$ -galactosidase; 5) Excreção da enzima  $\beta$ -galactosidase no meio; 6) A  $\beta$ -galactosidase metaboliza o substrato cromogênico CPRG (amarelo) em um produto vermelho (que pode ser medido pela absorvância entre 540 a 620 nm). Fonte: ROUTLEDGE; SUMPTER (1996).

### 3.5.4 Ensaios de mutagenicidade com *Salmonella*

O teste de mutagenicidade de *Salmonella*/microssoma, conhecido como teste de Ames, foi estabelecido por Bruce Ames em 1973 em Berkeley na Califórnia (AMES et al., 1973).

O teste é realizado com linhagens de *Salmonella typhimurium* contendo mutações pré-existentes no *operon* do gene histidina, que deixam a bactéria incapaz de sintetizar esse aminoácido essencial. Como a histidina é necessária para seu crescimento e a bactéria não pode produzi-la, precisa absorvê-lo do ambiente (meio de cultura, por exemplo) para poder crescer. Assim, quando cultivada em meio de cultura sem histidina em sua composição, fica impossibilitada de crescer e formar colônias. Se a bactéria sofre uma mutação que causa a reversão dessa condição para histidina (capacidade de sintetizar histidina), é restaurada a função do gene. A bactéria restaurada (chamada de “revertente”) passa a sintetizar histidina e, conseqüentemente, a crescer em meio de cultura sem histidina, formando colônias (AMES; HARTMAN, 1963; AMES et al., 1973; OECD, 1983; MORTELMANS, 2019), como exemplificado na figura 5. Além disso, essas bactérias apresentam mutações que aumentam a permeabilidade da parede celular (mutação *rfa*), o que permiti a melhor penetração de mutágenos e a deleção *uvrB*, um dos genes responsáveis pelo reparo por excisão, levando a um maior número de lesões reparadas por mecanismos sujeitos a erro, reduzindo a capacidade de reparo do DNA da célula e elevando a sensibilidade da detecção de mutágenos (WIECZERZAK; NAMIEŚNIK; KUDLAK, 2016).

**Figura 5** - Ilustração de revertentes em *S. typhimurium*



Fonte: Modificado de HIMRI et al., 2018.

O teste de Ames faz parte de uma bateria de ensaios padrão para a avaliação de vários tipos de substâncias normalmente exigida por algumas agências regulatórias do mundo como, por exemplo, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e FDA (Food and Drug Administration). Este ensaio é amplamente utilizado para detecção de mutágenos em amostras ambientais, incluindo águas fluviais e efluentes. Com o intuito de tornar o teste de Ames ainda mais sensível, Kado, Langley e Eisenstadt (1983) desenvolveram uma metodologia baseada no aumento da quantidade de bactérias utilizadas no ensaio e na redução da quantidade de amostra e mistura S9, o que aumentou em dez vezes a sensibilidade do teste.

O Guia OECD 471 – Ensaio de Mutação Reversa em Bactéria (OECD, 2020) recomenda o uso de um conjunto de linhagens de *S. typhimurium* para a avaliação do potencial mutagênico de substâncias, sendo as linhagens TA100 e TA1535 empregadas para detectar mutagênicos que induzem substituições de pares de bases e as linhagens TA1537, TA97, TA97a e TA98 utilizadas para detectar mutagênicos que levam a deslocamentos de quadros de leitura, como inserções e deleções.

As linhagens TA98 e TA100 normalmente são empregadas para estudos de triagem, pois são eficientes na detecção de uma ampla gama de agentes mutagênicos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Portanto, a utilização de diferentes bioensaios é fundamental para uma correta avaliação de novos tratamentos de efluentes.

**Tabela 1:** Resumo dos bioensaios utilizados no presente estudo.

<b>Bioensaio</b>	<b>Espécie</b>	<b>Efeitos tóxicos avaliados</b>	<b>Recomendação por Organização</b>
<i>Lactuca sativa</i> (alface)	<i>Lactuca sativa</i>	Fitotoxicidade	OECD (OECD, 2003).
Ensaio do Cometa	<i>Homo sapiens</i> , humano (carcinoma hepatocelular – HepG2/C3A)	Genotoxicidade	ASTM; OECD (ASTM, 2010, OECD, 2016a).
Ensaio do Micronúcleo	<i>Homo sapiens</i> , humano (carcinoma hepatocelular – HepG2/C3A)	Genotoxicidade	OECD (OECD, 2016b)
Ensaio de microssuspensão (Teste de Kado)	Cepas modificadas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98, TA 100	Mutagenicidade	OECD (OECD, 1997).
Estrogenicidade	Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YES) modificadas geneticamente	Estrogenicidade	ISO 19040-1: 2018

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

O presente estudo faz parte de um projeto conjunto, estabelecido em uma parceria com o Prof. Dr. Renato Falcão Dantas, da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, Limeira-SP, intitulado “Influência da composição do efluente secundário na desinfecção por processos oxidativos avançados”, processo FAPESP no. 14/17774-1. Esse projeto tem por objetivo estudar o comportamento dos principais componentes de efluentes de duas ETEs, durante as diferentes etapas do tratamento de desinfecção por processos oxidativos avançados (ozonização e UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), com o intuito de estabelecer doses seguras para uma correta desinfecção.

### 4.1 Efluentes utilizados no estudo

Os efluentes utilizados para o desenvolvimento deste estudo foram coletados após processo de tratamento convencional, em duas ETEs da cidade de Limeira-SP:

- **Efluente 1:** proveniente de uma estação piloto de tratamento de esgotos da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, Limeira/SP. Essa ETE utiliza, para o tratamento dos efluentes sanitários do campus, a Tecnologia RAFA (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente). Pelo fato deste efluente possuir uma composição constante e não conter esgoto de outra origem (industrial, hospitalar, etc), que não seja a sanitária da própria FT- Unicamp, ele não apresenta grandes variações em suas características físico-químicas e microbiológicas. A coleta dos efluentes foi realizada após a etapa de tratamento secundário. Os efluentes foram coletados em frascos de vidro âmbar com capacidade de 4L.
- **Efluente 2:** proveniente da ETE Águas da Serra da cidade de Limeira/SP, que realiza tratamento primário, seguido por tratamento com lodo ativado. Como a cidade de Limeira caracteriza-se por ser um dos principais polos da região na produção de joias e bijuterias, existe alguns descartes de efluentes irregulares de pequenos geradores (pequenos produtores de joias/bijuterias, pequenas galvânicas) na rede de esgoto municipal sem o devido tratamento, o que acarreta uma alta concentração de metais, além de aditivos industriais relacionados a este descarte indevido no efluente que chega na ETE. A coleta desses efluentes foi realizada dentro da ETE Águas da Serra após o tratamento do efluente por lodo ativado com auxílio dos funcionários da ETE. Os efluentes foram coletados em frascos de vidro âmbar com capacidade de 4 L.

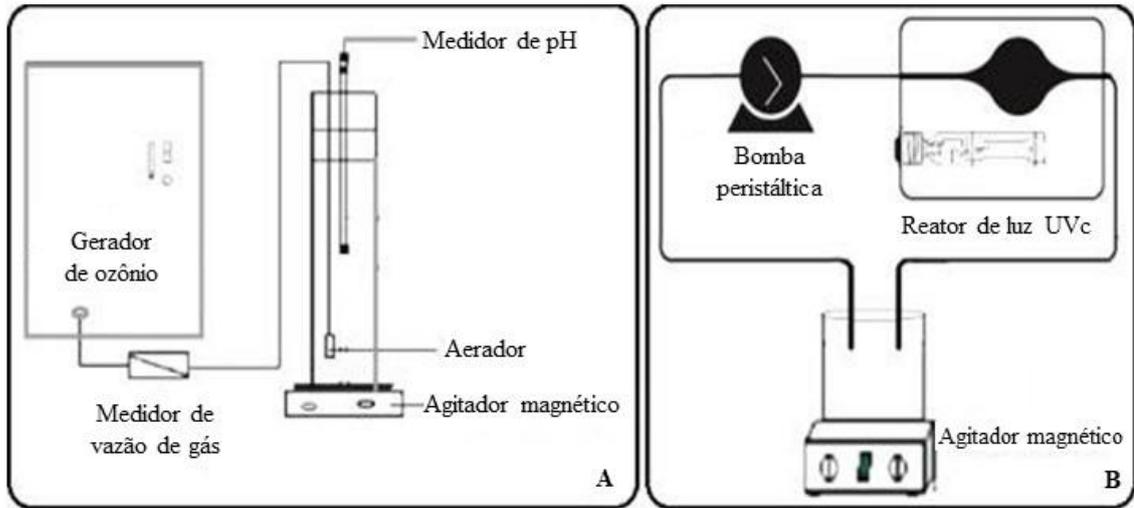
Para verificar a influência da sazonalidade na desinfecção e toxicidade dos efluentes, foram coletadas amostras dos mesmos em 2 períodos sazonais distintos, sendo um representativo da estação seca e outra da estação chuvosa. Os efluentes coletados foram acondicionados em frascos de vidros âmbar, previamente higienizados, esterilizados e identificados. Após a coleta, os efluentes foram levados, imediatamente, ao laboratório da FT-Unicamp, para serem submetidos aos processos de oxidação avançada.

#### 4.2 Tratamentos oxidativos avançados

Como uma alternativa aos métodos convencionais empregados no tratamento de esgoto, os efluentes das ETEs foram submetidos a dois processos distintos de desinfecção. Os experimentos foram feitos em bateladas e de modo independentes, usando os dispositivos experimentais descritos a seguir:

- **Experimento de ozonização:** Realizado em um reator cilíndrico de vidro, com 2 litros de capacidade, ligado a um gerador de ozônio (Ozonar GT 8000, Brazil), que borbulha o ozônio por difusores porosos de porcelana. A dose de ozônio aplicada foi de 5 e 10 mg/L e a taxa de fluxo foi de 4 L/min (Figura 6A) (MALVESTITI; DANTAS, 2018).
- **Experimentos de UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Realizado em um tanque de recirculação, com capacidade de 1 L, sob agitação constante, conferida por um agitador magnético conectado a uma bomba peristáltica (Provitec AWM 5000MB) e a um fotorreator UV-C de 150 mL, operando em recirculação contínua (Figura 6B). O fotorreator apresenta uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão (5W), que emite radiação em um comprimento de onda de 254 nm e um fluxo fotônico de cerca de  $9,5 \times 10^{-7}$  Einstein s<sup>-1</sup>. A dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada foi de 90 mg/L (MALVESTITI; DANTAS, 2018).

**Figura 6:** Representação esquemática do reator de ozônio (A) e do reator de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B).



Fonte: Modificado de Malvestiti e Dantas, 2018.

Para cada processo de oxidação avançada utilizado, foram aplicados tempos de reação de 20 (T1) e 40 (T2) minutos, sendo esses tempos definidos de acordo com Malvestiti e Dantas (2018) (Figuras 7 e 8). O maior tempo de reação foi escolhido baseado no período de tratamento recomendado para a total eliminação do organismo indicador *Escherichia coli*. Já o período intermediário (20 minutos) foi testado para acompanhar respostas intermediárias ocasionais durante o processo de tratamento. Decorridos cada período, foram coletadas uma amostra de cada efluente tratado (Figura 9), que foram destinadas, diretamente, à realização dos bioensaios ou à extração em fase sólida.

**Figura 7-** Experimento de oxidação avançada do efluente secundário com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



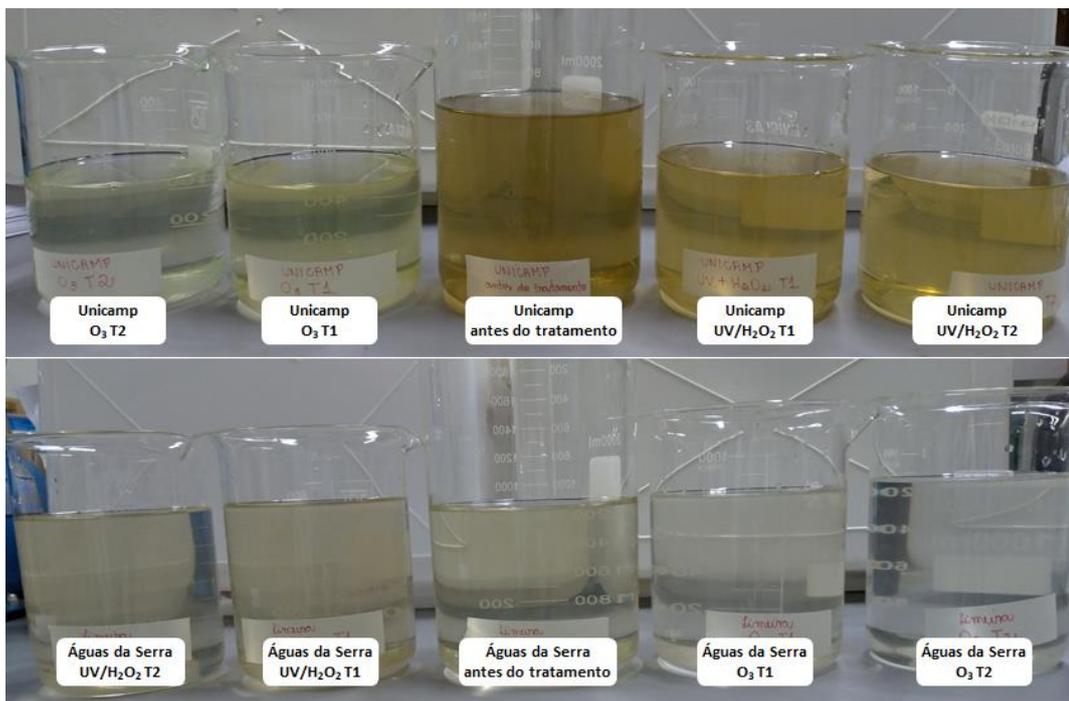
Fonte: autora

**Figura 8 -** Experimento de oxidação avançada do efluente secundário com ozônio



Fonte: autora

**Figura 9-** Amostras dos efluentes antes e após tratamentos oxidativos avançados.



Fonte: autora

### 4.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas pelo Prof. Dr. Renato Falcão Dantas, da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, Limeira/SP. Essas análises fazem parte do projeto de Jovem Pesquisador da FAPESP do referido pesquisador, ao qual o presente projeto está vinculado.

Foi realizada a caracterização dos efluentes urbanos, de acordo com os parâmetros físico-químicos usuais, como DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), pH, SST (Sólidos Suspensos Totais), alcalinidade, turbidez e UV<sub>254</sub>.

### 4.4 Extração em fase sólida (EFS)

Os efluentes sanitários constituem uma matriz complexa, que podem conter uma infinidade de substâncias químicas. Dessa forma, a utilização de um método de extração adequado é de fundamental importância para a correta identificação dos compostos de interesse. A EFS vem sendo um método recomendado pela sua melhor eficiência na remoção dos interferentes de uma matriz, além de possibilitar a concentração e o isolamento dos analitos de interesse (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; YU; WU, 2012).

As amostras dos efluentes coletados (1 litro de cada amostra) foram transportadas para o laboratório e extraídas por EFS, em até 24 horas após a coleta (Figura 10 e 11). Inicialmente,

as amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro (47mm de diâmetro, grau MGA, marca *Sartorius stedim biotech*), para a eliminação do material particulado. Para a EFS, 500 mL de cada amostra descritas anteriormente (item 4.1) foram passadas por cartucho Oasis HLB (500 mg, 6 mL-Waters, Milford, MA, EUA), pré-condicionados em 6 mL de metanol (grau HPLC) e 6 mL de água ultrapura (Figuras 10 e 11). Após a passagem das amostras pelos cartuchos, esses foram completamente secos e armazenados a -20 °C.

Para a obtenção dos extratos, os cartuchos foram eluídos, sequencialmente, com 7,5 mL de éterdietílico, 7,5 mL de acetato de etila e 4 vezes de 1 mL de metanol (solventes de diferentes polaridades). Todos os reagentes apresentavam grau HPLC. Em seguida, os extratos foram secos sob fluxo suave de nitrogênio gás, até a completa evaporação dos solventes (Figura 12). Posteriormente, os materiais foram ressuspensos em 500 µL de DMSO, o que resultou em um extrato concentrado 1000X. Os extratos foram mantidos em frascos de vidro âmbar e armazenados a -20 °C, até a realização dos ensaios. Esses extratos foram utilizados para os ensaios com leveduras recombinantes e de *Salmonella*/microsoma.

**Figura 10** - Ilustração de parte do procedimento realizado para a extração em fase sólida com cartucho Oasis HLB.



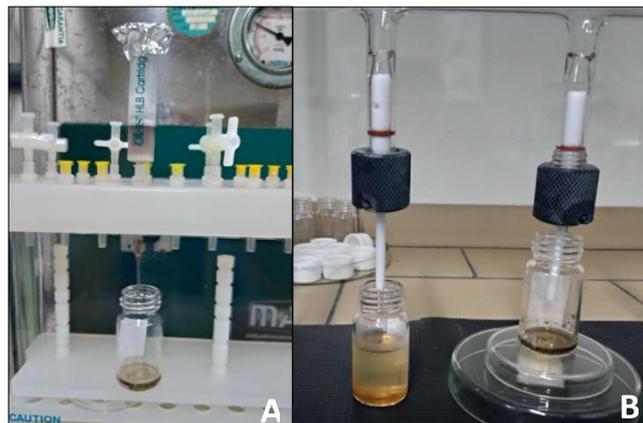
Fonte: autora.

**Figura 11-** Colunas de vidro contendo as amostras dos efluentes conectadas aos seus respectivos cartuchos para extração.



Fonte: autora.

**Figura 12-** Eluição (A) e secagem (B) dos extratos.



Fonte: autora.

Dessa forma, foram utilizados nos bioensaios amostras não concentradas e concentradas, de acordo com a tabela 2.

**Tabela 2:** Amostras utilizadas da ETE Unicamp e ETE Municipal (antes e após POA) e tipo de amostra empregada em cada bioensaio.

Amostras utilizadas	Tipo de amostra	Alvo	Endpoint de toxicidade	Ensaio
Antes dos tratamentos; Ozonização T1; Ozonização T2; UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1; UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2	Não concentrada	Bactérias patogênicas	-	Identificação e quantificação de bactérias (BD Phoenix <sup>TM</sup> e MALDI-TOF)
		Planta ( <i>Lactuca sativa</i> )	Fitotoxicidade	Germinação e Crescimento: <i>Lactuca sativa</i>
	Concentrada (cartucho Oasis)	Células humanas (HepG2/C3A)	Genotoxicidade	Cometa Micronúcleo
		Bactéria ( <i>Salmonella typhimurium</i> )	Mutagenicidade	<i>Salmonella</i> /microsome (Teste de Kado)
		Levedura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Estrogenicidade	YES ( <i>Yeast Estrogen Screen</i> )

T1: tempo de 20 minutos de reação; T2: tempo de 40 minutos de reação; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; Não concentrada: refere-se as amostras líquidas que não passaram por processo de extração em fase sólida; Concentrada: refere-se aos extratos orgânicos das amostras obtidos após extração em fase sólida por cartucho Oasis.

#### 4.5 Análises microbiológicas

A caracterização microbiológica das amostras foi realizada em parceria com Prof. Dr. Carlos Emilio Levy, do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas/SP.

##### 4.5.1 Diluição, semeadura e identificação de microrganismos das amostras

Para a diluição das amostras, foi adicionado, individualmente, 1 mL da referida amostra, em 9 mL de solução salina estéril a 0,85%. Após homogeneização em vórtex, 1 mL das misturas foi transferido para novos frascos contendo 9 mL de solução salina. Para obtenção da solução final, foi realizada mais uma diluição, na mesma proporção das diluições anteriores. Em seguida, foram semeados 100 µL (por meio de pipeta automática), 10 µL e 1 µL (por meio de alça calibrada descartável) das três diluições nos meios: Ágar Sangue, Ágar MacConkey, Ágar Sabouraud e Cromoágar UriSELECT 4 (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, França).

As placas semeadas foram incubadas, de 24 horas a 7 dias em estufa a 35 °C, com exceção das placas de ágar Sabouraud. Após este período, as placas foram analisadas, quanto ao tipo e quantidade de colônias. A avaliação da densidade e da contagem da microbiota presente nas amostras foi feita por método quantitativo. A identificação das colônias foi feita

inicialmente pelo equipamento de automação BD Phoenix<sup>TM</sup> 100 (Becton Dickinson, USA) e, posteriormente, por MALDI-TOF.

- **Identificação por BD Phoenix<sup>TM</sup>**

A identificação das bactérias seguiu as recomendações do fabricante. O caldo de identificação (ID) foi inoculado com colônias de bactérias puras e ajustado ao Mc Farland 0,5. O ID foi inoculado nos painéis de identificação gram-negativos e gram-positivos. Os resultados foram analisados usando o software Epicenter versão 7.22 (Becton Dickinson, USA) (YAN et al., 2011).

O sistema BD Phoenix<sup>TM</sup> utiliza diversos testes bioquímicos convencionais, cromogênicos e fluorogênicos para identificar o organismo substratos cromogênicos e fluorogênicos, bem como substratos que são fontes única de carbono, para a identificação de organismos.

- **Identificação de bactérias por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight)**

As análises foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Seyfarth et al. (2008). Foi coletada e transferida uma colônia (~ 50 µg) de cada uma das linhagens de em placa de Petri previamente inoculada com a cultura, para spots da placa de 48 poços, específica do equipamento, juntamente a 2 µL de uma solução matriz (75 mg/mL, 2,5 ácido diidroxibenzoico em etanol/água/acetoneitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético) (experimento realizado em triplicata). Esta matriz foi sobreposta ao esfregão da célula e, após a secagem do material em temperatura ambiente, foi iniciada a análise, por meio da emissão de feixes de laser sobre cada um dos spots. Para a calibração interna, foram utilizadas as proteínas ribossomais de linhagens de *Escherichia coli* DH5α, por essas já possuem seus valores de massas conhecidos.

A faixa de m/z 2.000 a 20.000 Daltons foi determinada, utilizando um modo linear. O espectrômetro de massas foi operado em modo linear, com atraso de 104 ns, a uma voltagem de 20 kV.

Os espectros finais foram gerados somando-se 20 disparos de laser por perfil e 50 perfis reduzidos por amostras, levando a um total de até 10.800 disparos de laser por espectro. As listas de picos resultantes foram exportadas para o software Maldi Biotyper 1.1<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas com os picos das amostras foram comparadas com seu banco de dados, por meio do programa Biotyper<sup>TM</sup>, a fim de se obter a identificação do microrganismo em questão.

## 4.6 Ensaios biológicos

### 4.6.1 Bioensaio com *Lactuca sativa*

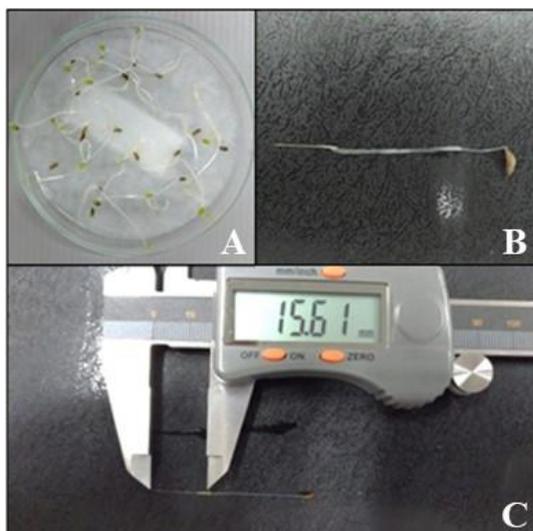
Os bioensaios com o organismo teste *L. sativa* foram realizados com a variedade Grand Rapids (Isla<sup>®</sup>), de acordo com metodologia proposta por Sobrero e Ronco (2004). Para cada tratamento, foram dispostas 20 sementes sobre papel filtro em placa de Petri. Posteriormente, foi adicionado à cada placa 4 mL de cada uma das amostras. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O controle positivo (CP) foi realizado com a solução de sulfato de zinco 0,05 M. Inicialmente foi preparada uma solução mãe 0,3 M, pela dissolução de 8,63 g de sulfato de zinco (marca: Shynth) em 100 mL de água ultrapura. Uma alíquota de 7,5 mL dessa solução foi adicionada em 37,5 mL de água ultrapura, para ser então utilizada nos experimentos. O teste controle negativo (CN) foi realizado com água ultrapura.

As placas de Petri foram mantidas em uma incubadora, no escuro, por 120 horas a 22 °C. Após este período todas as placas foram congeladas, para posterior realização de medidas das radículas e dos hipocótilos, com um paquímetro digital (marca: Digimess), conforme ilustrado na Figura 13.

A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism 9.0. Os dados de germinação, comprimento de hipocótilo e de radícula foram analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido do teste Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas para comparar os resultados dos tratamentos com os do CN, com 95% de nível de confiança.

**Figura 13-** Ensaio com *Lactuca sativa*.



**A:** Placa de Petri contendo sementes de alface germinadas. **B:** Plântula de alface (contém as estruturas de hipocótilo e radícula). **C:** Paquímetro digital utilizado para medição das estruturas de hipocótilo e radícula (a medida presente no paquímetro, 15,61, equivale a radícula do indivíduo fotografado em milímetros). Fonte: autora.

#### 4.6.2 Ensaio com cultura de células

- **Linhagem celular**

Foram utilizadas células humanas da linhagem HepG2/C3A (Human-derived Hepatoma cell), adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. O cultivo foi feito em frascos de cultura estéreis de 25 cm<sup>2</sup>, contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução de antibiótico-antimicótico (10.000 U.I./mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina), mantidos em estufa BOD a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

- **Tratamentos**

Para a realização dos ensaios, as amostras dos efluentes tiveram seu pH corrigido para 7,3 e temperatura ajustada para 37 °C (HARA; MARIN-MORALES, 2017).

Posteriormente, foi realizada a esterilização das amostras, utilizando filtro de seringa com membrana de poliestersulfona, com 33mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade. Para o controle negativo, foi utilizado PBS e para controle positivo, uma solução aquosa de metilmetanosulfonato ( $4 \times 10^{-2}$  M).

O volume das amostras (efluentes e controles) foi equivalente a 20% do volume final da mistura (amostra e meio de cultura) (HARA; MARIN-MORALES, 2017). Foram adicionados em cada frasco, 1 mL da amostra correspondente a cada tratamento e 4 mL de meio de cultura suplementado, totalizando 5 mL de volume final. O período de exposição dos tratamentos foi de 3 horas. Esse tratamento foi realizado nos ensaios do cometa e do micronúcleo.

#### **4.6.2.1 Ensaio do cometa**

- **Teste de viabilidade com Azul de Trypan**

Para a realização do ensaio do cometa, foi realizado, previamente, um teste de viabilidade celular com Azul de Trypan. As células foram coletadas e avaliadas, quanto a sua viabilidade, no dia da realização do ensaio do cometa. Para a realização deste teste, foram transferidos 20 µL da suspensão celular, de cada tratamento, para eppendorfs previamente identificados. A suspensão celular foi homogeneizada com 20 µL de Azul de Trypan. Posteriormente, foram transferidos os 40 µL para uma câmara de Neubauer, para a identificação e contagem das células brancas (células viáveis) e das azuis (não viáveis). Em seguida, foi calculada a porcentagem das células viáveis. Quando a viabilidade celular foi igual ou maior que 80%, deu-se continuidade ao experimento.

- **Teste do cometa**

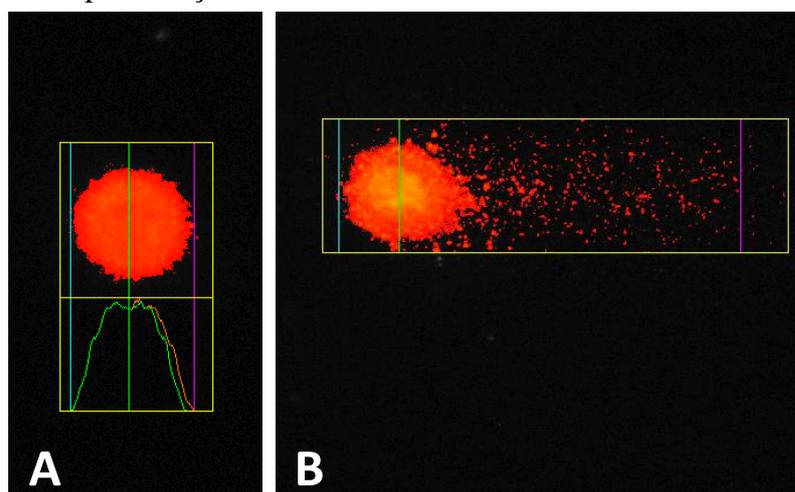
Após 3 horas de exposição aos tratamentos, foi realizada a coleta da suspensão celular. O meio de cultura foi descartado e os frascos lavados 2 vezes com 5 mL de PBS. Após a retirada do excesso de PBS, as células foram tripsinizadas, por 5 minutos, sob condições de estufa a 37 °C. Posteriormente, a tripsina foi inativada com 5 mL de meio DMEM completo. A suspensão celular foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugados, por 5 minutos, a 1500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando no tubo apenas 0,5 mL de solução, onde as células foram ressuspendidas.

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas previamente cobertas com agarose comum, com 20 µL da suspensão celular mais 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 6 °C,

por 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese, contendo o tampão de corrida eletroforética (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), por 20 minutos, para a denaturação do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com 3 banhos de 5 minutos cada, em tampão de neutralização (pH 7,2). Após neutralização, as lâminas foram fixadas, por 10 min, em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas, imediatamente após a sua coloração. Foram analisados, em microscopia de fluorescência Leica (modelo: DM 4000B), objetiva de 40x, filtro B - 34 (excitação:  $\lambda = 420 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$ , barreira:  $\lambda = 520 \text{ nm}$ ), 50 nucleoides por lâmina (LOVELL; OMORI, 2008; REISINGER et al., 2018), totalizando 300 nucleoides por tratamento (Figura 14). Os danos nos nucleoides foram avaliados pelo software *Comet Assay IV*, de acordo com os parâmetros porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de *Olive* (KUMARAVEL et al., 2009; OECD, 2014a). Os *outliers* foram removidos para evitar superestimativas (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009; YANUARYSKA, 2018). Esta remoção foi feita empregando o software GraphPad Prism 8.0.1, pelo método ROUT, conforme recomendado por Motulsky e Brown (2006).

**Figura 14-** Representação das análises realizadas no Software Comet Assay IV.



A: nucleoide sem danos; B: nucleoide com danos no DNA. Fonte: autora.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0, considerando os valores médios da porcentagem de DNA na cauda e momento de cauda de *Olive*, de cada lâmina. Inicialmente, foi realizado a normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Foi usada como teste paramétrico, a análise de variância

ANOVA – um critério, seguido do *post hoc* Dunnet. Já o teste de Kruskal-Wallis foi empregado como teste não paramétrico, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi de  $p < 0,05$ .

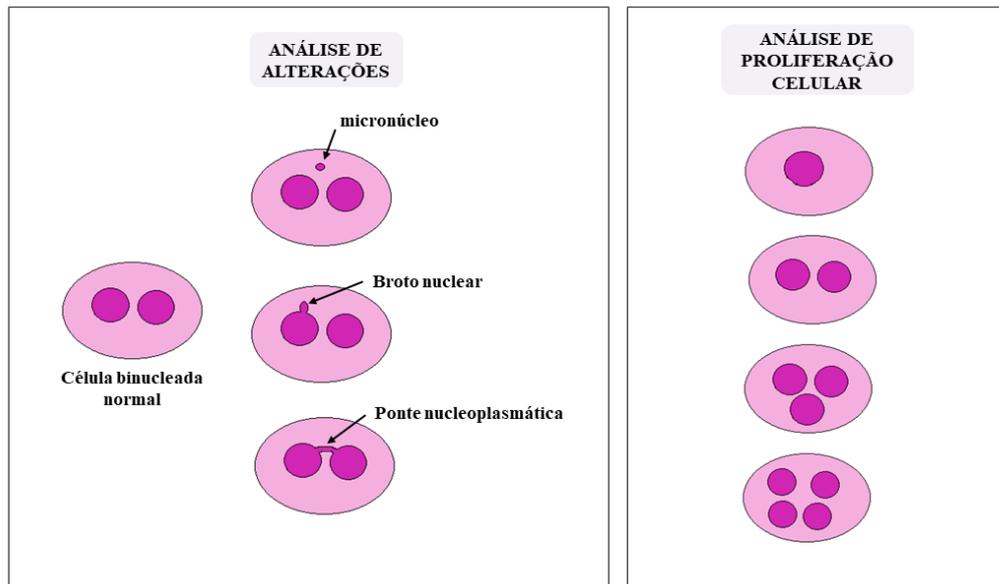
#### **4.6.2.2 Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese**

Para a realização do teste do micronúcleo, foi utilizada a técnica descrita por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações, como segue: após cultivo celular por um ciclo celular completo (24 horas), foram realizados tratamentos simultâneos de 3 horas, com a adição das amostras filtradas dos efluentes, antes e após o tratamento de desinfecção (três frascos para cada amostra) e os tratamentos controles.

Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS. Foram adicionados aos frascos, 5 mL de meio de cultura completo e 50 µL de solução de citocalasina B a 350 µg /mL (solução de uso). Após 30 horas de incubação, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (metanol/ácido acético 3:1 – v:v). Posteriormente, foram depositadas algumas gotas da cultura de células sobre lâminas limpas e geladas, contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram submetidas a reação de Feulgen, por 2 horas (Reativo de Schiff) e, posteriormente, coradas com Giemsa 5%, por 8 minutos.

Foram analisadas, sob microscopia de luz (aumento de 1.000 X), cerca de 6000 células por tratamento, sendo contabilizadas, aproximadamente, 1000 células de duas lâminas, para cada uma das triplicatas realizadas. Foram consideradas na análise, apenas células binucleadas que apresentaram membrana citoplasmática e envoltório nuclear íntegros, além de núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração. A presença de MN, brotos e pontes nessas células foi considerada como derivado do potencial genotóxico do material analisado (Figura 15).

**Figura 15-** Esquema representativo das principais alterações encontradas no ensaio e, análise da proliferação celular pela contagem da quantidade de núcleos.



Fonte: autora.

Também foi realizada a quantificação do índice de proliferação por bloqueio de citocinese (IPBC), de acordo com o guia 487 da OECD (2016b), pela contagem de 500 células por lâmina, cujo cálculo foi feito de acordo com a Equação a seguir:

$$\text{IPBC} = \frac{N1 + (2 \times N2) + (3 \times N3)}{\text{Número total de células}}$$

Onde: N1: número de células com 1 núcleo;  
 N2: número de células com 2 núcleos;  
 N3: número de células com 3 ou mais núcleos;

Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como teste paramétrico, foi usada a análise de variância ANOVA – um critério, seguido do *post hoc* Dunnet. Já o teste de Kruskal-Wallis foi empregado como teste não paramétrico, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi  $p < 0,05$ .

#### 4.6.3 Ensaio com leveduras recombinantes – YES (*Yeast Estrogen Screen*)

A cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada neste ensaio, contém um gene alfa do receptor de estrogênio humano transfectado (hER $\alpha$ ) e um plasmídeo de expressão, contendo o gene repórter lacZ que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase, que é usado como um marcador para medir a atividade dos receptores. Assim, a interação entre um ligante ativo e o receptor leva a expressão do gene repórter lac-Z e a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase. Deste modo, na presença de um substrato fluorogênico, pode ser medida, fotometricamente, a quantidade de enzima  $\beta$ -galactosidase secretada.

Para a detecção da atividade estrogênica, pelo ensaio de YES, seguiu-se os protocolos descritos por Wagner e Oehlmann (2009) e Völker et al. (2016).

Para obtenção do cultivo, uma colônia isolada em placa contendo meio específico foi transferida para o meio líquido, seguida de incubação *overnight* a 30 °C. Anteriormente à realização do teste, a cultura foi ajustada a uma densidade celular ótima (25 FAU - unidades padrão para turbidez).

Os tratamentos foram preparados em meio 5x, contendo 1% (v/v) das amostras, de modo que o extrato fosse diluído 100X. O meio mínimo 5x foi suplementado com 100  $\mu$ M de sulfato de cobre, 0,67 mg/mL de ampicilina e estreptomicina. O controle negativo foi realizado com o meio 5x e o controle positivo com uma diluição seriada de 17 $\beta$ -estradiol em meio 5x (em 1% v/v de etanol, 3pM-100nM concentração).

A cada um dos poços de uma placa de 96 poços, foram adicionados 75  $\mu$ L de água ultrapura, 25  $\mu$ L das respectivas amostras ou controle e 20  $\mu$ L do cultivo celular (com exceção dos poços referentes ao branco). Em cada placa, foram realizadas 8 réplicas de cada amostra. As placas de 96 poços foram seladas com uma membrana semi-permeável (Breathe-Easy, Diversified Biotech, Boston, MA, USA), para evitar evaporação das amostras, e incubadas, por 20 horas, a 30 °C, sob agitação.

Para verificar o potencial citotóxico de cada amostra e, assim evitar mascarar a atividade endócrina, o número de células foi determinado, fotometricamente, a 595 nm. Uma viabilidade superior a 75% foi utilizada para considerar uma amostra não citotóxica. Posteriormente, foi transferido 30  $\mu$ L da solução presente em cada poço, para o poço correspondente de uma placa de 96 poços preta. 50  $\mu$ L do substrato fluorescente (4-methyl-umbelliferone  $\beta$ -D-galactopiranoside) foram adicionados em cada poço. As placas retornaram para a incubadora, nas mesmas condições, por 1 hora. A atividade do gene repórter foi mediada em um leitor de

microplacas (marca TECAN, modelo infinite M200PRO), com um comprimento de onda de 360 nm para excitação e de 465 nm para emissão.

Para a análise dos resultados, as densidades ópticas foram corrigidas de acordo com os valores do branco e da densidade celular relativa. Foi calculada, para cada medição, a relação dose-resposta para o 17 $\beta$ -estradiol (ligante referência), usando uma função logarítmica do Software GraphPad Prism 9.0. A atividade agonista de cada amostra foi expressa como concentração equivalente (EQ) da concentração do ligante referência 17 $\beta$ -estradiol.

#### 4.6.4 Ensaio *Salmonella*/microsoma – modificação de Kado (microsuspensão)

- **Linhagens de bactéria**

Para a realização do teste de *Salmonella*/microsoma, foram empregadas duas linhagens diferentes de *Salmonella typhimurium*. A linhagem TA98, que detecta mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura e apresenta mutação no gene responsável pela síntese de histidina tipo hisD3052, e a linhagem TA100, que detecta mutação do tipo substituição de pares de base e apresenta mutação responsável pela síntese de histidina tipo hisG46.

- **Procedimento do teste**

As linhagens foram colocadas para crescer em frascos individuais contendo caldo nutriente, os quais foram incubados em shaker a 37 °C, overnight, com agitação constante (170 rpm). Então, a densidade celular ótima da cultura crescida foi ajustada para 10<sup>9</sup> células/mL, a partir da leitura de turbidez, em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 650 nm. Na sequência, a cultura crescida foi centrifugada a 4°C a 10.000 g, durante 10 min, o meio sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuscitado em 2 mL de tampão fosfato 0,15M, para possibilitar a concentração do cultivo bacteriano em 10X.

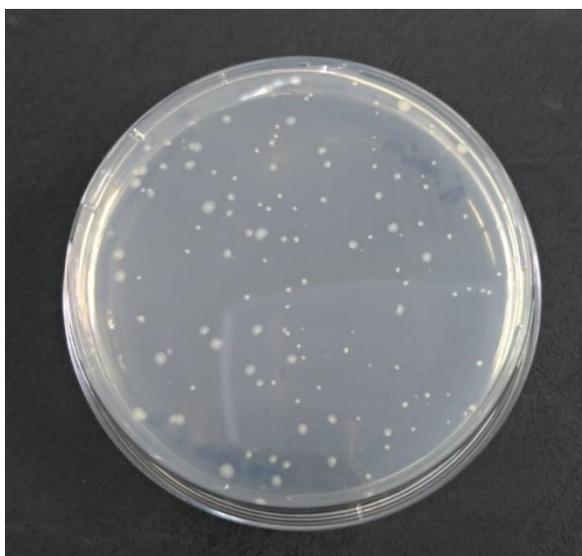
Posteriormente, 100  $\mu$ L do cultivo (10<sup>10</sup> células/mL) foram adicionados em tubos de cultura contendo 100  $\mu$ L de tampão fosfato 0,1M e 100  $\mu$ L da amostra a ser testada (ou 25  $\mu$ L de substância usada no controle positivo – CP ou 100  $\mu$ L de água de osmose reversa para o controle negativo - CN). Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9, o tampão fosfato foi substituído por 100  $\mu$ L de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl<sub>2</sub> 0,4M) e fração S9]. Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 90 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis contendo ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas invertidas em estufa

bacteriológica a 37 °C por 72 horas. Cada amostra foi testada em triplicata e em 6 diferentes diluições (60X; 120X; 240X; 480X; 960X; 1920X).

Para o desenvolvimento do teste com ativação metabólica, foi utilizado um sistema de metabolização exógeno (Sistema microssomal S9, Molttox), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com a mistura bifenil policlorinada (Aroclor 1254). Como CPs, foram utilizados o óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56-57-5), na concentração de 0,05 µg/µL, para os testes realizados na ausência de ativação metabólica e o 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25 µg/µL, para os testes realizados na presença de ativação metabólica.

Para a análise de mutagenicidade, foram quantificadas visualmente as colônias de bactérias revertentes (Figura 16). Os dados foram avaliados estatisticamente pelo programa SALANAL (Samonella Assay Analysis 1.0), selecionando os modelos de Bernstein ou Linear, onde são considerados positivos os resultados significativos de ambos testes estatísticos utilizados [ANOVA ( $p < 0,05$ ) e da regressão linear ( $p < 0,05$ )]. Os resultados foram expressos pelo número de revertentes por mL da amostra testada.

**Figura 16** - Colônias de bactérias revertentes.

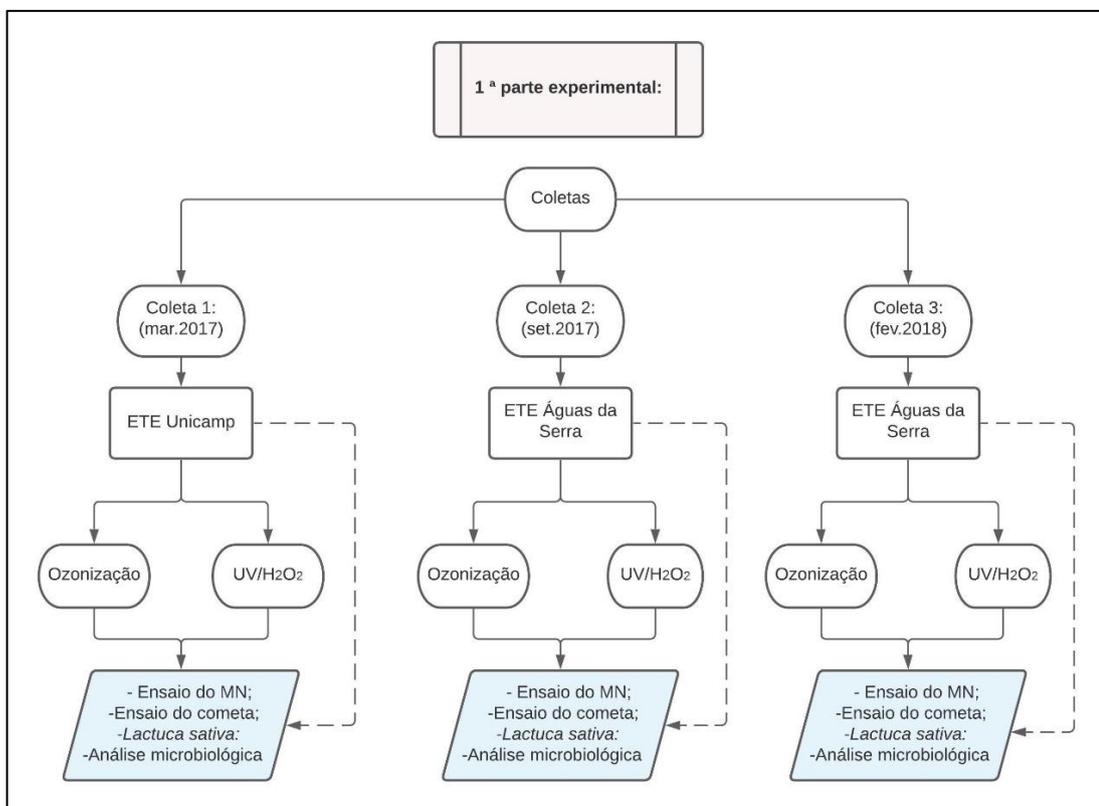


Os pontos brancos presentes na placa são as colônias de bactérias que cresceram em ágar mínimo. Fonte: autora.

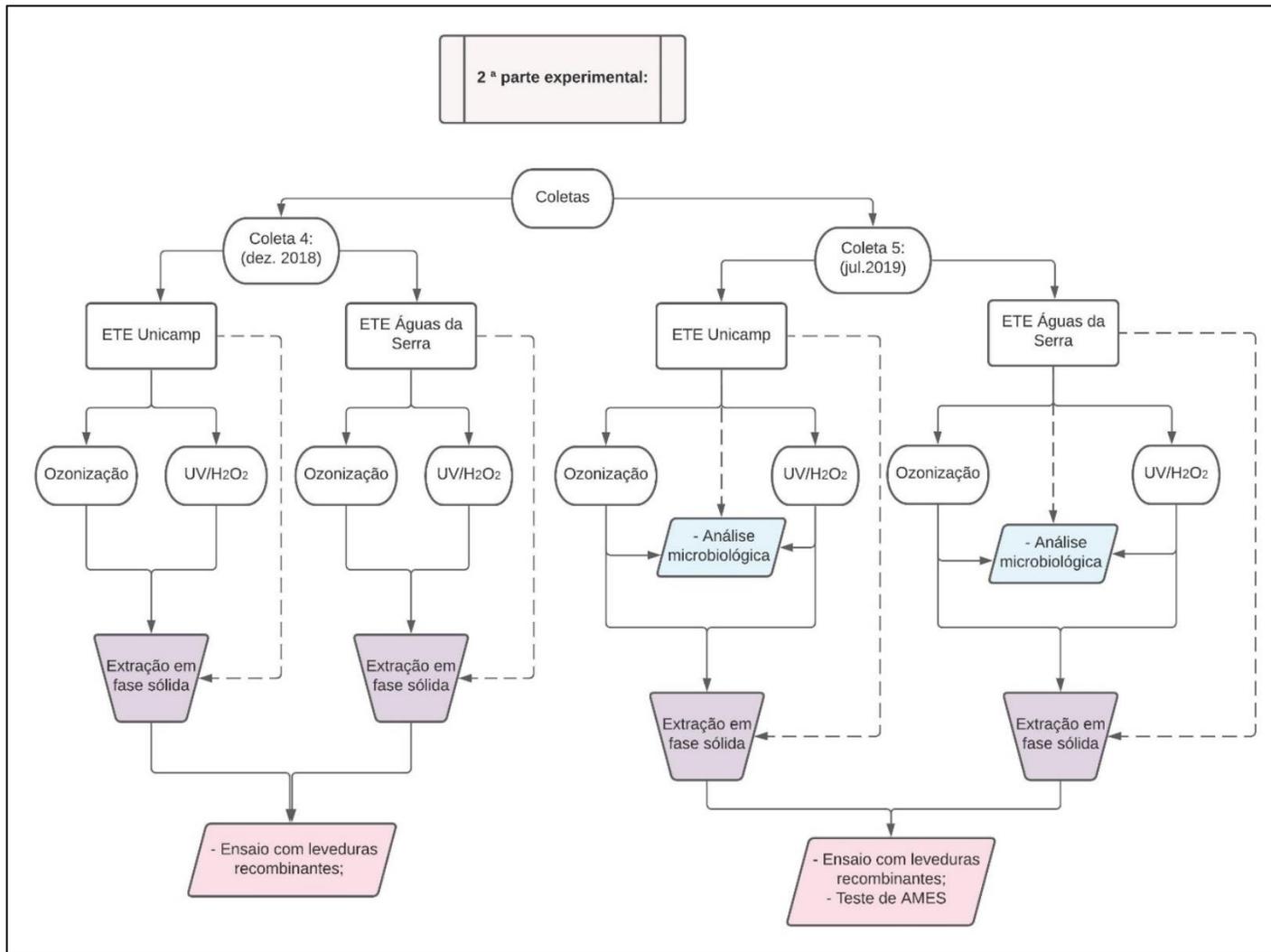
#### 4.7 Fluxograma referente as etapas da pesquisa

Foram necessárias a realização de diversas coletas para a realização do presente estudo, já que uma parte dos experimentos foram desenvolvidas com as amostras brutas e uma outra parte com os extratos das amostras. Dessa forma, as coletas dos efluentes e os experimentos foram divididos em duas etapas, que se encontram detalhadas nas figuras 17 e 18 representativas dos fluxogramas experimentais.

**Figura 17** - Fluxograma 1: Referente a primeira parte experimental, onde testou-se os efluentes *in natura*.



**Figura 18-** Fluxograma 2: Referente a segunda parte experimental, no qual após as coletas foram realizados os processos de extração



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do efluente secundário, antes e após o emprego de processos oxidativos avançados (POA)

A caracterização dos efluentes estudados, descritos nas Tabelas 3 e 4, refere-se à média dos valores encontrados em diferentes coletas realizadas, durante o desenvolvimento do projeto, para os parâmetros pH; SST (sólidos suspensos totais); alcalinidade; UV<sub>254</sub> (monitoramento da carga orgânica, por meio da radiação UV, no comprimento de onda de 254); turbidez; DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio).

**Tabela 3:** Caracterização de amostras do efluente secundário obtidos na estação de tratamento de esgoto da Faculdade de Tecnologia da Unicamp (Limeira, SP- Brasil), antes e após os processos de oxidação avançada.

ETE Unicamp			
Parâmetros	Antes dos POA	Após O <sub>3</sub>	Após UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
pH	6,94 ± 0,43	7,14 ± 0,96	6,86 ± 0,68
SST (mg L <sup>-1</sup> )	74,85 ± 5,32	13,4 ± 1,03	20,5 ± 1,53
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	487,6 ± 34,2	89,8 ± 15,40	108,1 ± 27,9
UV <sub>254</sub> (cm <sup>-1</sup> )	1,28 ± 0,08	0,21 ± 0,02	0,72 ± 0,05
Turbidez (NTU)	78,1 ± 7,32	14,2 ± 3,12	19,4 ± 4,3
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	202 ± 8,60	71,2 ± 8,33	105,2 ± 26,31
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	63,8 ± 7,41	20,1 ± 3,85	32,13 ± 4,63

SST: Sólidos Suspensos Totais; DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

**Tabela 4:** Caracterização de amostras do efluente secundário obtidos na estação de tratamento de esgoto Municipal, Águas da Serra da cidade de Limeira (SP-Brasil), antes e após os processos de oxidação avançada.

<b>ETE Municipal</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Antes dos POA</b>	<b>Após O<sub>3</sub></b>	<b>Após UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
pH	7,14 ± 0,43	7,2 ± 0,51	6,74 ± 0,42
SST (mg L <sup>-1</sup> )	36,7 ± 1,80	18,2 ± 1,35	22,5 ± 0,90
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	324,4 ± 20,4	204,3 ± 23,66	208,3 ± 16,5
UV <sub>254</sub> (cm <sup>-1</sup> )	0,0605 ± 0,05	0,0531 ± 0,25	0,0467 ± 0,11
Turbidez (NTU)	63,1 ± 5,70	52,2 ± 6,20	50,1 ± 6,93
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	96,2 ± 8,60	48,4 ± 10,23	52,4 ± 8,32
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	18,79 ± 0,67	5,82 ± 0,84	5,53 ± 0,79

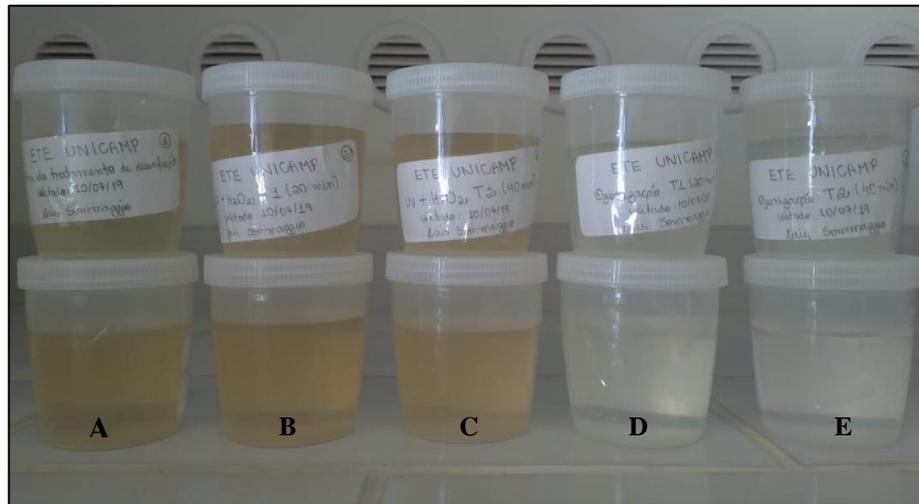
SST: Sólidos Suspensos Totais; DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

O pH das amostras dos efluentes, antes dos tratamentos oxidativos avançados, apresentaram valores próximos da neutralidade: ETE Unicamp, pH = 6,94 e ETE Municipal, pH = 7,14. O pH pode ser um fator limitante para ecossistemas aquáticos, devido aos seus efeitos sobre a fisiologia de diversas espécies (CETESB, 2015). Por esta razão, é importante que o pH do efluente tratado esteja próximo da neutralidade. Os valores de pH das amostras de ambos os efluentes, após os tratamentos de ozonização (O<sub>3</sub>) ou radiação ultravioleta mais peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), encontraram-se dentro de uma faixa adequada para reuso ou retorno aos recursos hídricos.

O efluente secundário da ETE Unicamp apresentou índices de SST e de turbidez maiores que os do efluente secundário da ETE Municipal. A presença de sólidos suspensos e a alta turbidez nas amostras pode influenciar diretamente a ação do processo de desinfecção, já que essas características interferem na transmissividade da radiação UV e podem diminuir a eficiência do tratamento (GONÇALVES, 2003). Após os tratamentos propostos com O<sub>3</sub> e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi observado uma redução tanto da quantidade de SST como da turbidez, para ambos os efluentes tratados. Também foi possível observar, visualmente, mudança na cor dos

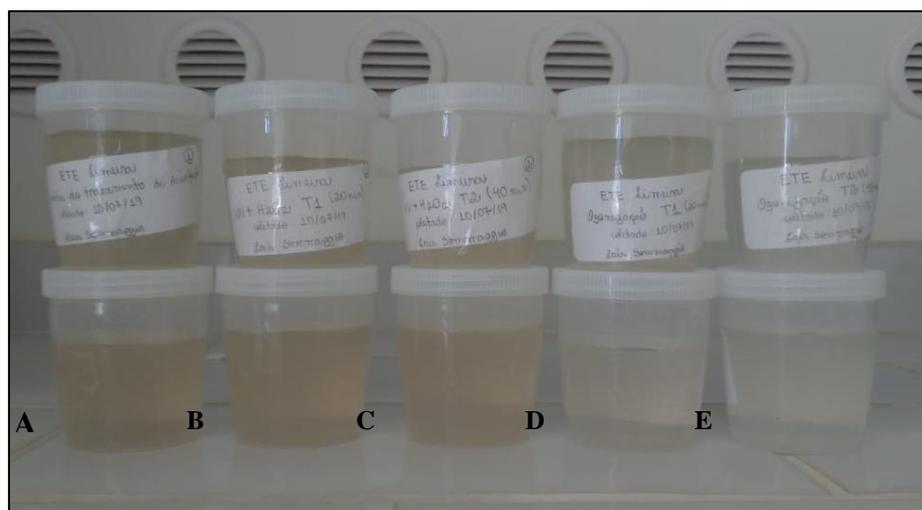
efluentes, após os tratamentos com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O tratamento com O<sub>3</sub>, se mostrou mais efetivo na remoção da cor, quando comparado com o efluente sem tratamento (Figura 19 e 20).

**Figura 19:** Amostras de efluente da ETE Unicamp, antes e após os processos de oxidação avançada.



**A:** Amostra de efluente antes do processo de desinfecção; **B e C:** amostra de efluente após tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **D e E:** amostra de efluente após tratamento com O<sub>3</sub>. Fonte: autora.

**Figura 20:** Amostras do efluente da ETE Municipal (Águas da Serra da cidade de Limeira), antes e após os processos de oxidação avançada.



**A:** Amostra de efluente antes do processo de desinfecção; **B e C:** amostra de efluente após UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **D e E:** amostra de efluente após O<sub>3</sub>. Fonte: autora.

A alcalinidade também foi maior para o efluente da ETE Unicamp, quando comparado ao da ETE Municipal. Após a aplicação dos tratamentos, foi observada uma diminuição desse parâmetro em ambos os efluentes. A alcalinidade pode indicar que o efluente em questão apresenta características corrosivas ou incrustantes.

Com relação a matéria orgânica, medida pela  $UV_{254}$ , o efluente coletado na ETE Unicamp apresentou valores maiores que o do efluente da ETE Municipal. A  $UV_{254}$  monitora a carga orgânica, uma vez que, de maneira geral, a matéria orgânica absorve luz UV nesse comprimento de onda. Quanto à presença de matéria orgânica biologicamente degradável, expressa em DBO (parâmetro correspondente a quantidade de oxigênio consumido na degradação da matéria orgânica por processos biológicos), o maior valor determinado foi para o efluente da ETE Unicamp (63,8 mg/L de  $O_2$ ). Ambos os processos oxidativos empregados neste estudo foram eficientes para a melhoria desses padrões, para os dois efluentes estudados.

Para o parâmetro de DQO (quantidade de oxigênio dissolvido consumido em meio ácido, que leva à degradação de matéria orgânica total), também foi observado um valor maior para o efluente da ETE Unicamp. Os POAs são indicados para aplicação em amostras de DQO de até  $5\text{ g L}^{-1}$ , uma vez que conteúdos mais elevados requerem quantidades muito grandes de reagentes, ou o emprego de um pré-tratamento, antes de sua aplicação (PERA-TITUS et al., 2004). Ambos os efluentes estudados apresentaram DQO abaixo de  $5\text{ g L}^{-1}$  ( $0,202\text{ g L}^{-1}$  para o efluente ETE Unicamp e  $0,0962\text{ g L}^{-1}$  para o efluente ETE Municipal). É sempre importante conhecer as características físico-químicas do efluente, antes da aplicação de um processo oxidativo avançado, para que o mesmo seja efetivo. Após os tratamentos com  $O_3$  e  $UV/H_2O_2$ , foi observada uma diminuição dos valores de DQO das amostras de ambos os efluentes, o que indica que esses processos também contribuíram para uma melhora da qualidade do efluente tratado, em termos de diminuição de sua carga orgânica total.

Como pode ser observado na tabela 3 e 4, todos os parâmetros analisados, com exceção do pH, após os processos oxidativos avançado, apresentaram uma diminuição de seus valores. Portanto, podemos inferir que houve uma melhora dos aspectos físico-químicos dos efluentes, após o emprego dos POAs. A melhora na qualidade físico-química de efluentes tratados por POA também foi relatada em diversos estudos (JERÔNIMO, 2012; MALVESTITI, DANTAS, 2018; RIBEIRO et al., 2017; RIZZO, 2011).

## 5.2 Artigos

Os demais resultados obtidos na presente pesquisa serão apresentados a seguir, em formato de artigo.

**Artigo 1:** Avaliação da remoção de bactérias patogênicas de efluentes secundários durante a ozonização e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Artigo 2:** Monitoramento do potencial fitotóxico e genotóxico de águas residuárias submetidas a processos oxidativos avançados

**Artigo 3:** Investigação dos potenciais estrogênicos e mutagênicos de efluentes secundários tratados por processos oxidativos avançados

## Artigo 1

---

### **Avaliação da remoção de bactérias patogênicas de efluentes secundários durante a ozonização e UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O reuso de águas residuais é uma estratégia importante para a gestão dos recursos hídricos. Dependendo do uso pretendido para o efluente tratado, o mesmo não pode conter indicadores biológicos antes da sua reutilização. A desinfecção por processos oxidativos avançados (POA), como ozonização e UV / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é uma alternativa interessante, embora poucos estudos abordem a caracterização microbiológica do efluente produzido. Neste estudo, efluentes secundários de duas ETEs com características distintas foram expostos aos tratamentos O<sub>3</sub> ou UV / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo realizada uma caracterização microbiológica por BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, EUA) e MALDI-TOF antes e após a aplicação dos tratamentos. Os resultados mostraram que a maior dose de ozônio e o tratamento com UV / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram eficazes na remoção do indicador biológico *Escherichia coli*. No entanto, UV / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mais eficiente, pois eliminou a maioria dos microrganismos, enquanto os gêneros *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* e *Pseudomonas* ainda foram encontrados nos tratamentos de ozonização. *Bacillus* sp. foi o microrganismo mais resistente, sendo encontrado mesmo após os tratamentos de O<sub>3</sub> e por UV / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Devido aos riscos ambientais e à saúde humana promovidos pelos microrganismos patogênicos presentes nos efluentes tratados para reaproveitamento, há a necessidade de avaliar não apenas a presença de microrganismos utilizados rotineiramente como indicador biológico, mas também outros microrganismos que possam apresentar potenciais patogênicos.

## Assessment of pathogenic bacteria removal from secondary effluents during ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Lais Roberta Deroldo Sommaggio<sup>1</sup>, Flávio A. Oliveira<sup>2</sup>, Jacqueline Aparecida Malvestiti<sup>3</sup>, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo<sup>4</sup>, Carlos Emílio Levy<sup>2</sup>, Renato Falcão Dantas<sup>3</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (Unesp), Av. 24-A, 1515, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Alexander Fleming, 105, 13081-970 Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup> School of Technology, University of Campinas – UNICAMP, Paschoal Marmo 1888, 13484332, Limeira, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Biotechnology, Plant and Animal Production, Center for Agricultural Sciences, Federal University of São Carlos (UFSCAR), Araras, SP, Brazil.

Wastewater reuse is an important strategy for the management of water resources. Depending of the intended use of the treated effluent, it must be exempt from biological indicators before reuse. Disinfection by advanced oxidation processes (AOP), such as ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, is an interesting alternative, although few studies address the microbiological characterization of the produced effluent. In this study, secondary effluents from two WWTPs with different characteristics were exposed to O<sub>3</sub> or UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments and evaluated by BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, USA) and MALDI-TOF in order to perform the microbiological characterization before and after treatments. The results showed that the highest ozone dose and the treatment with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were effective in removing the biological indicator *Escherichia coli*. However, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was more efficient since it eliminated most of the microorganisms, while i.e. *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* and *Pseudomonas* were still found ozonation. *Bacillus* sp. was the most resistant microorganism, being found after treatment by O<sub>3</sub> and by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Due to the environmental risks and human health promoted by pathogenic microorganisms present in treated effluents for reuse, there is the need to evaluate not only the presence of microorganisms routinely used as a biological indicator, but also other microorganisms that may present pathogenic potential.

**Keywords:** water management, disinfection, advanced oxidation processes, wastewater, Gram positive bacteria, *Bacillus* sp.

## 1. Introduction

Population growth, accelerated industrialization, agricultural practices and urbanization lead to an increasing demand for water, water bodies' deterioration and a large increase in the amount of generated wastewater. According to the World-Wide Fund for Nature (WWF), 70% of the global population may suffer water scarcity by the year 2025 (WWF, 2020), which renders integrated water resources management a necessity (Lazarova et al., 2001).

The effluents generated by human activity must be properly treated at wastewater treatment plants (WWTP) before being discharged into the receiving water bodies in order to protect public health and the environment. It occurs through the removal of biodegradable material, organic pollutants, nutrients and pathogens (Levine; Asano, 2004; Kirk et al., 2002; Morris et al., 2017). Apart from the correct treatment of effluents, the wastewater reuse emerges as an interesting and reliable strategy for water resource management. This practice may carry an important role as part of water demand and supply as well as wastewater treatment and disposal systems, thus contributing to an effective environmental protection (Jiménez et al., 2010; Lazarova et al., 2001; Miller, 2006). Recycling effluents from anthropic activities also reduces water stress as it reduced water uptake from water bodies (Meneses, Pasqualino, Castells, 2010; Salgot; Folch, 2018).

To practice a proper municipal effluent reuse, the wastewater recovery and treatment processes at the WWTP should produce a final effluent with sufficient quality for various non-potable uses (Sala; Serra, 2004). Treated wastewater can be used in agriculture, leisure, landscaping, among others non-potable uses (Salgot; Folch, 2018). Therefore, its application should be regulated to prevent the use of recycled water with inadequate quality, which can cause human diseases (Dickin et al., 2016), mainly those related to the presence of pathogenic microorganisms. Table 1 presents some examples of pathogenic bacteria and the associate diseases.

**Table 1.** Reports of pathogens group and associated diseases

Group	Pathogen	Reports of associated diseases	References
Enteric bacteria	<i>Citrobacter freundii</i>	Infected fish usually exhibited lethargy, hemorrhage and liver granuloma; gastroenteritis in human.	Aminharati et al., 2019 Jeremic et al., 2003 Sun et al., 2018
	<i>Enterobacter</i> spp.	Septicemia and meningitis in preterm and full-term infants and necrotizing enterocolitis in neonates (human).	Gurtler; Beuchat, 2005 Lai, 2001 van Acker et al., 2001
	<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis in human and animals.	Cai; Ju; Zhang, 2014 Schuetz, 2019 Wang et al., 2014
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	It is involved in extra-intestinal infections including urinary tract infections, cystitis, pneumonia, surgical wound infections and life-threatening infections, such as endocarditis and septicemia in human.	Navon-Venezia; Kondratyeva; Carattoli, 2017
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Inhabit aquatic environments, reports of Urinary tract infections, gastrointestinal infections, pneumonia, wound and skin infections, and bacteraemia.	Seng et al., 2016
Environmental bacteria	<i>Acinetobacter</i> spp.	Infections in the respiratory tract of hospitalized patients. Skin infections in fish.	Forster; Daschner, 1998 Luna; Aruj, 2007 Pekala-Safinska, 2018
	<i>Aeromonas</i> spp.	Gastroenteritis in human and animals; wound infection and soft tissue infection; extra intestinal infections, such as skin and soft-tissue infections, traumatic wound infections, and lower respiratory tract/urinary tract infections in human.	An et al., 2018 Razavi et al., 2017 Schuetz, 2019 Zhang; Shao; Ye, 2012
	<i>Bacillus</i> spp.	Food poisoning. Gastroenteritis in human and animals and wound infection, food spoilage, Anthrax.	Buelow et al., 2018 Shchegolkova et al., 2016
	<i>Burkholderia</i> sp.	Diseases in onion and rice crops. Opportunistic infections in CF patients	Burkholder, 1950

			Ham; Melanson; Rush, 2011 Dentini et al., 2017
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Food poisoning, wound infection, Gastroenteritis/cholera nosocomial pathogen in human.	Buelow et al., 2018 Hong et al., 2018 Manaia et al., 2018
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Skin diseases and hemorrhages in internal organs of fish.	Pazdzior, 2016
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Infections in the respiratory tract and bloodstream in human.	Chang et al, 2015

Most international water reuse guidelines are based on the State of California (USA) guidelines (State of California, 1978) and on the World Health Organization guidelines (WHO, 1989). While California's guideline presents 'zero risk' to microorganisms, which is based on the fact that pathogenic microorganisms can survive for days, weeks and sometimes months in soil and crops (Licciardello et al., 2018), WHO guidelines follow a 'calculated risk', which is based on epidemiological evidence. California Water Recycling Criteria requires total coliform bacteria to be less than 23 MPN (most probable number)/100 mL for irrigation of non-food crops (EPA, 2012). The standards for the restricted reuse of wastewater in the São Paulo State (Brazil) are thermotolerant coliforms  $\leq 200$  CFU/100 mL and *E. coli*  $\leq 120$  CFU/100 mL (SES/SIMA, 2020). Nevertheless, to reach international levels of wastewater reuse, in addition to secondary treatment technologies, the use tertiary treatments to further reduce nutrients, suspended solids, xenobiotics, and especially microorganisms is necessary. Thus, the produced water will be of sufficient quality to be harnessed safely and legally (Salgot; Folch, 2018).

Advanced oxidation processes (AOP) are an efficient alternative for wastewater treatment (Oturán; Aaron, 2014). They are based on the generation of hydroxyl radicals ( $\text{HO}^*$ ), which is a highly reactive and poorly selective chemical specie, allowing chemical oxidation of a wide range of substances (Tiburtius et al., 2015; Dantas et al., 2009; Rizzo, 2011; Malvestiti; Dantas, 2018), as well as effluents disinfection (Etchepare et al., 2014). Among AOP, the most common and cost-effective are those that use ozone (ozonation) and the combination of ultraviolet radiation with hydrogen peroxide (UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

The inactivation of the pathogenic microorganisms by ozone can be due to direct molecular  $\text{O}_3$  reaction or indirectly via the formation of highly oxidative radicals such as  $\text{HO}_2^*$

and HO<sup>•</sup> (Von Gunten, 2003). Both via affects the permeability disrupting the cell membranes and protoplasm, enzymatic activity, and DNA of bacterial cells (Antonioni et al., 2013; Bitton, 2005; Zimmermann et al., 2011). The UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inactivation may be attributed to the combination of lethal effects of hydroxyl radical, free oxygen radicals and the UV radiation (Alam; Ohgaki, 2002; Alkan et al., 2007).

AOP proved to be able to treat secondary effluents and produce water with quality to be reused, according to different legislations (Liberti et al., 2000; Lubello, Caretti, Gori, 2002, Souza et al., 2013). However, most of the current legislation about wastewater reuse uses as microbiological indicators the total coliforms and *Escherichia coli*. In some cases, more resistant biological indicators are used in order to guarantee the absence of pathogenic bacteria in the recycled water (EPRS, 2020; SES/SIMA, 2020; USEPA, 2012; WWAP, 2017).

The measurement of pathogenic bacteria in wastewater disinfection studies are almost absent in the current literature, since it is accepted that after the biological indicator inactivation, they would not be present. The objective of this study was to revisit this concept and assess the presence of pathogenic bacteria after ozone and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment with the usual oxidant doses. In order to perform this evaluation, secondary effluents were subjected to ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments and the samples were characterized before and after different oxidant doses. The removal of different classes of microorganisms was assessed as well as comments on the biological safety of the produced effluent were addressed.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Secondary effluent samples**

The effluents used for the development of this research were collected from two different WWTPs in the city of Limeira (São Paulo State, Brazil). The first one was from a pilot WWTP at the School of Technology of the University of Campinas (Unicamp, Brazil). The pilot plant is composed by an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB), which receives wastewater mainly from the kitchen, bathrooms and laboratories from the campus. This effluent was named in this study as gray water (GW) since it did not have the contribution of industrial, hospital or orders common effluents sources, which mainly contributed to municipal effluents. The second effluent, named as urban wastewater (UW), came from the Águas da Serra WWTP, which is located in the city of Limeira (São Paulo State, Brazil). The Águas da Serra WWTP is equipped with secondary treatment composed by an activated sludge biological treatment.

Two independent samplings of GW and three of UW were collected in different seasons of the year, drought and rainy seasons in the state of Sao Paulo (Brazil). The samples were

taken in March and September of 2017, February of 2018 and July of 2019. The effluents were stored in glass bottles previously cleaned and sterile. Then, after each sampling campaign, they were taken to the laboratory and, immediately subjected to disinfection by ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The characterization of the physical-chemical parameters of the effluent samples was made according to the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA, WEF 2012).

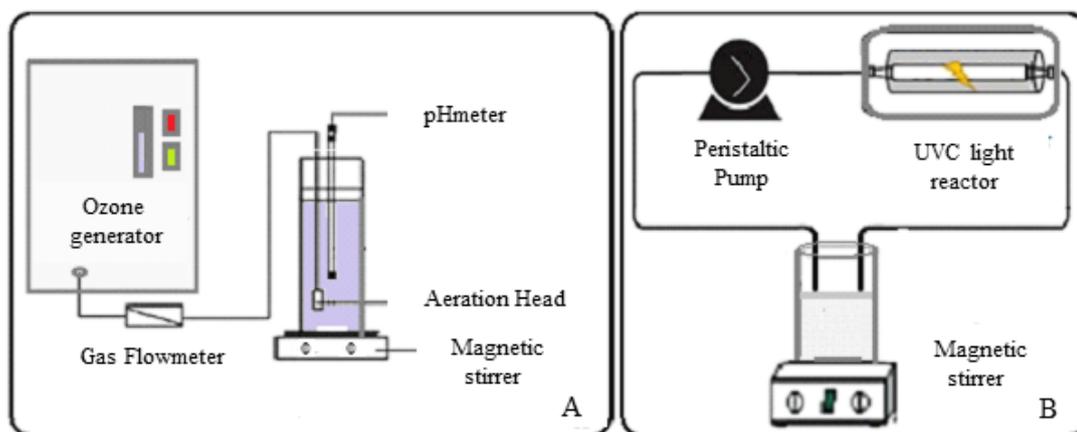
## 2.2 Ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments

The effluents collected after the biological treatments were subjected to ozonation or UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The treatments were previously adjusted to achieve the inactivation of total coliforms and *E. coli*, thus different oxidant doses were tested (Malvestiti et al., 2019). Both treatments were carried out in batch mode at the same day when samples were collected.

Ozonation was held in a cylindrical glass reactor with 2 liters of capacity connected to an ozone generator (Ozonar GT 8000, Brazil), which bubbled ozone through porous porcelain diffusers inside the reactor. The applied ozone dose was 5 and 10 mg L<sup>-1</sup> and the feeding gas flow rate was 4 L min<sup>-1</sup> (Figure 1A).

UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments were performed in a 150 mL UVC photoreactor connected to a recirculation tank with 1L of capacity. The effluent inside the reactor was recirculated by a peristaltic pump (Provitec AWM 5000MB, Brazil) and underwent a continuous stirring provided by a magnetic stirrer (Figure 1B). The photoreactor had a low-pressure mercury lamp UVC (5W), which emits radiation at a wavelength of 254 nm and with a photonic flux of about  $9.5 \times 10^{-7}$  Einstein s<sup>-1</sup>. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose used for the experiment was 90 mg L<sup>-1</sup> and residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured by the metavanadate method (Nogueira et al. 2005) and quenched by the addition of sodium bisulfite in the molar ratio of 1H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:1NaHSO<sub>3</sub>. See supplementary material (Table SM1). More details about the experimental devices can be found elsewhere (Malvestiti et al., 2019).

For each treatment process, reaction times of 20 (T1) and 40 (T2) minutes were applied. These reaction times were previously defined as necessities to achieve a certain level of disinfection of the samples (Malvestiti et al., 2019; Malvestiti; Dantas, 2018). After each period, 60 mL of samples were collected in a sterile sample collection bottle. Then, these samples were subjected to microbiological analysis. To ensure reproducibility, both treatments were performed in duplicate.



**Figure 1:** Schematic representation of the ozone reactor (A) and the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reactor (B).

## 2.3. Microbiological analysis

### 2.3.1 Dilution, inoculation and microorganisms identification

In order to perform the microorganisms identification, 1 mL of each sample was added in 9 mL of a 0.85% sterile saline solution. After vortex homogenization, 1 mL of the mixture was transferred to a new flask containing 9 mL of saline solution. To obtain the final dilution, another dilution was performed, in the same way as described. Then, 100  $\mu$ L (using an automatic pipette), 10  $\mu$ L and 1  $\mu$ L (using a disposable calibrated loop) were inoculated from the three dilutions on the following media: Blood Agar, MacConkey Agar, Sabouraud Agar (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France).

The plates were incubated at 35 °C for 24h until seven days, except for the Sabouraud agar plates, which were kept at room temperature. The daily analysis was done to detect enough growing and different morphological characteristics. The bacterial counting was based on phenotypic characteristics of the colonies. The colonies were identified initially by BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, USA) and further, by MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) Microflex LT™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### 2.3.2 Identification by BD Phoenix™

The bacteria identification was carried out by a BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, USA), following the manufacturer's recommendations. The identification broth (ID) was inoculated with pure bacterial colonies and adjusted to the McFarland of 0.5. ID broth was inoculated on the identification panels for Gram-negative (NID) and Gram-positive (PID). The results were analyzed using the Epicenter software version 7.22 (Becton Dickinson, USA) (YAN et al., 2011).

### 2.3.3 Identification by MALDI-TOF

The analyzes were performed according to the protocol described by Seyfarth et al. (2008). With this purpose, one colony (~ 50 µg) was collected and transferred from each strain from a Petri dish previously inoculated with the culture to spots on the 48-well plate, specific of the equipment, along with 1 µL of a matrix solution (75 mg mL<sup>-1</sup>, 2.5 dihydroxybenzoic acid in ethanol/water/acetonitrile [1:1:1] with 0.03% trifluoroacetic acid). This matrix was superimposed on the cell smear and, after drying the material at room temperature, the analysis was started by emitting laser beams on each spot. For internal calibration, ribosomal proteins from *Escherichia coli* DH5a strains were used since these already have their known mass values.

The final spectra were generated by laser shots and the resulting peak lists were exported to Maldi Biotyper 3.1™ software (Bruker Daltonics, Germany). The lists with the peaks of the samples were compared with their database, using the Biotyper™ program, to obtain the identification of the microorganism.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Effluents characterization

Table 2 presents the average of the physicochemical characteristics used to characterize the quality of all the used effluent samples. GW came from an UASB pilot plant that received wastewater mainly from the kitchen, bathrooms and laboratories of the University campus. It presented effluent physicochemical parameters values higher than UW, which comes from the municipal WWTP. That difference may be due the UASB pilot plant was not as effective on the organic matter removal as the municipal WWTP. Other fact to be considered is the difference in the effluent organic matter from GW and UW. Despite UW presents lower organic matter content due to the effective activated sludge treatment, it has a much more complex water matrix since it presents industrial, hospital and other municipal source of contamination. This difference on the water matrix of the tested effluents was considered important to the study since ozone and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inactivation of bacteria in different wastewater matrix might lead to different disinfection profiles depending to the effluent composition.

**Table 2.** Physicochemical characterization of secondary effluent samples

<b>Parameters</b>	<b>GW</b>	<b>UW</b>
pH	7.0 ± 0.3	6.7 ± 0.5
TSS (mg L <sup>-1</sup> )	70.4 ± 5.2	27.8 ± 2.6
Alkalinity (CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	381.6 ± 32.4	204.3 ± 16.1
Turbidity (NTU)	73.2 ± 5.3	30.1 ± 2.4
UV <sub>254</sub> (Abs)	1.47 ± 0.18	0.21 ± 0.07
Color (PtCo)	307 ± 21.3	121 ± 4.6
COD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	153.4 ± 17.7	79 ± 7.1
BOD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	63.2 ± 9.2	29.5 ± 2.3

GW: gray wastewater; UW: urban wastewater; TSS: total suspended solids; COD: chemical oxygen demand; BOD: biochemical oxygen demand.

### 3.2 Sampling and climatic data

To perform this study, five effluent samples collections were carried out. Two samplings of GW and three of UW were carried out in different seasons in order to cover the drought and the rainy season in Brazil. The sampling period was from March of 2017 to July of 2019, thus it was possible to collect samples with precipitation varying from 26.5 to 219.3 mm and around 7 °C of temperature variation (Table 3). The variation on the climatic condition was important since seasonal variation of temperature and flow in a wastewater treatment plants has a significant role on their treatment efficiency, altering the microorganism's population density in the wastewater (Saleem et al. 2000, 2003). More detailed information about the climatic condition can be found in supplementary material (Table SM2).

**Table 3.** Average monthly data of precipitation (mm) and temperature (°C) in the city of Limeira SP (Brazil) during the sampling periods.

Precipitation (mm)													
Year	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec	Average
2017	293.9	76.5	<b>125.4</b>	125.8	123.2	18.0	0	34.7	<b>16.5</b>	183	219.3	164.4	115.06
2018	155.2	<b>83.8</b>	140.6	41.7	26.7	9.3	2.5	99.8	83.9	215.9	172.9	140.8	97.758
2019	113.5	201.6	164.2	156.2	25	12.5	<b>26.5</b>	14.6	34.1	67.2	154.5	149.2	93.258
Average	187.5	120.6	143.4	107.9	58.3	13.3	9.7	49.7	44.8	155.4	182.2	151.5	102.03
T °C													
Year	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec	Average
2017	23.5	24.4	<b>22.9</b>	20.7	18.9	17	16.1	18	<b>21.7</b>	22.5	23.4	21.6	20.875
2018	23.2	<b>22.5</b>	24.2	20.9	18.3	18.7	18.4	17	19.8	21.5	22	23.4	20.825
2019	24.9	23.7	23.2	22.1	20.3	18.2	<b>16.6</b>	18.2	20.8	23.8	23	23.2	21.5
Average	23.9	23.5	23.4	21.2	19.2	18.0	17.0	17.7	20.7	22.6	22.2	23.3	21.1

Source: CIIAGRO, 2020

Bold numbers: sampling period

### 3.3 Microorganisms

The results of the microbiological characterization of the studied effluent showed a great variation in relation to the species of microorganisms present in the samples collected before and after the AOP disinfection and also among the studied effluents (GW and UW).

Concerning the GW, two samplings were performed for microbiological characterization, in which a total of 12 genera of bacteria and two types of fungus were detected. In the first sampling, 10 genera of bacteria and one of fungus were identified, while in the second sampling 8 genera of bacteria and one of fungus were detected. Among the detected bacteria in GW, 5 genera were present in both samples (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* and *Escherichia*). In the case of UW, 3 samplings were performed with a total of 15 genera of bacteria and one filamentous fungus detected. For collections 1 and 2, 8 genera of bacteria were found, while for collection 3, 9 genera of bacteria were identified. *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Bacillus* were bacteria genera present in all the UW collections. Only in sampling 2 there was the presence of a fungal species. The genera that coincided among all collections and WWTP were *Aeromonas* and *Bacillus*.

It is important to mention that diverse microorganisms were found in different collections, some of which were present before the treatment while others were found only after the effluent treatment with AOPs. The microbiome and nutrients present in the samples can

lead to a variation in the microbiological community, favoring the growth of certain species to the detriment of others. The microbial composition of wastewater is related to abiotic parameters (e.g., amount of oxygen) and competition among species of microorganisms (Numberger et al., 2019). Furthermore, selective culture media for the growth and detection of some groups of bacteria was used, the detected bacteria were only a part of the total microorganism's population present in these samples. The change in the microbiota between the samples of the same effluent occurred because the samplings were carried out on different periods, precisely to study different microorganisms that could be present in these effluents. Thus, the disinfection capacity of the studies processes was tested with different microorganisms present in the samples.

### 3.3.1 Enterobacteria

The enterobacteria, order *Enterobacterales* (Adeolu, 2016) includes many genera and species of gram-negative bacteria, some of which are considered important pathogens for humans. These bacteria have a wide distribution in the water, soil and intestinal flora of many animals. Some genera, such as *Salmonella*, are adapted to man and are considered primary pathogens, while others, such as *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. *Enterobacter* spp., are part of the normal microbiota of humans, and can behave as opportunistic pathogens (Fariñas; Martínez-Martínez, 2013). Some Gram-negative bacilli, including some enterobacteria, are progressively more resistant to specific antibiotics such as beta-lactam antibiotics. They are considered a serious public health problem and according to the World Health Organization classified as a priority critical (Tacconelli et al., 2017). The resistance of some enterobacteria to beta-lactam antibiotics was initially described in hospital settings, however new studies have reported the presence of these bacteria in agricultural cultures, food and different waterbodies (Nascimento et al., 2017; Zekar et al., 2017). One of the sources of those antibiotic resistant bacteria are the effluents of WWTP (Aristizábal-Hoyos et al. 2019).

*Klebsiella pneumoniae* was identified in two samples. It is a gram-negative pathogen of the *Enterobacterales* and a natural inhabitant of the gastrointestinal tract microbiome of healthy humans and animals. Its presence in plants, soil, water and sewage has been also reported (Podschun et al. 2001; Navon-Venezia et al., 2017). This microorganism has an accessory plasmid genome that divides its strains into groups of opportunistic, hypervirulent and multiresistant bacteria. The opportunistic *K. pneumoniae* infect patients with severe or immunocompromised diseases, whereas hypervirulent strains can infect healthy people causing serious infections. The group that encodes carbapenemases usually are resistant to other classes

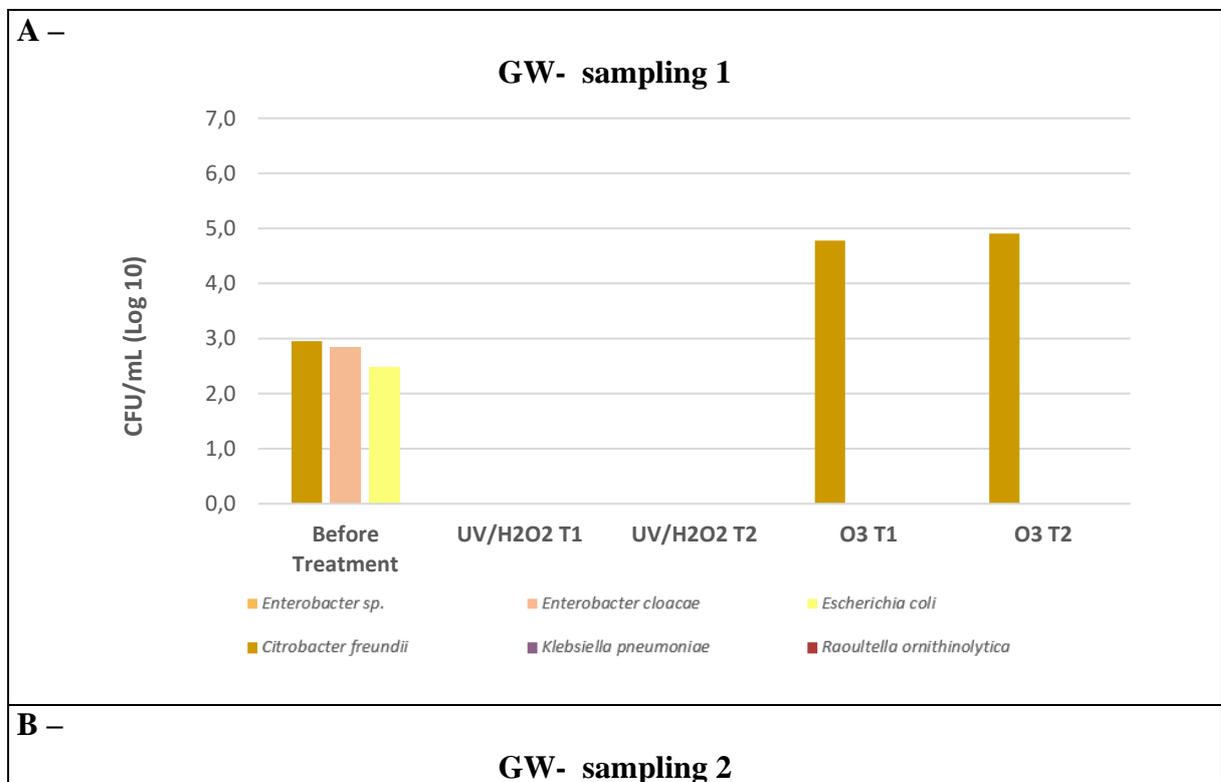
of antibiotics and considered multidrug-resistant to antibiotics (Martin; Bachman, 2018; Navon-Venezia et al., 2017).

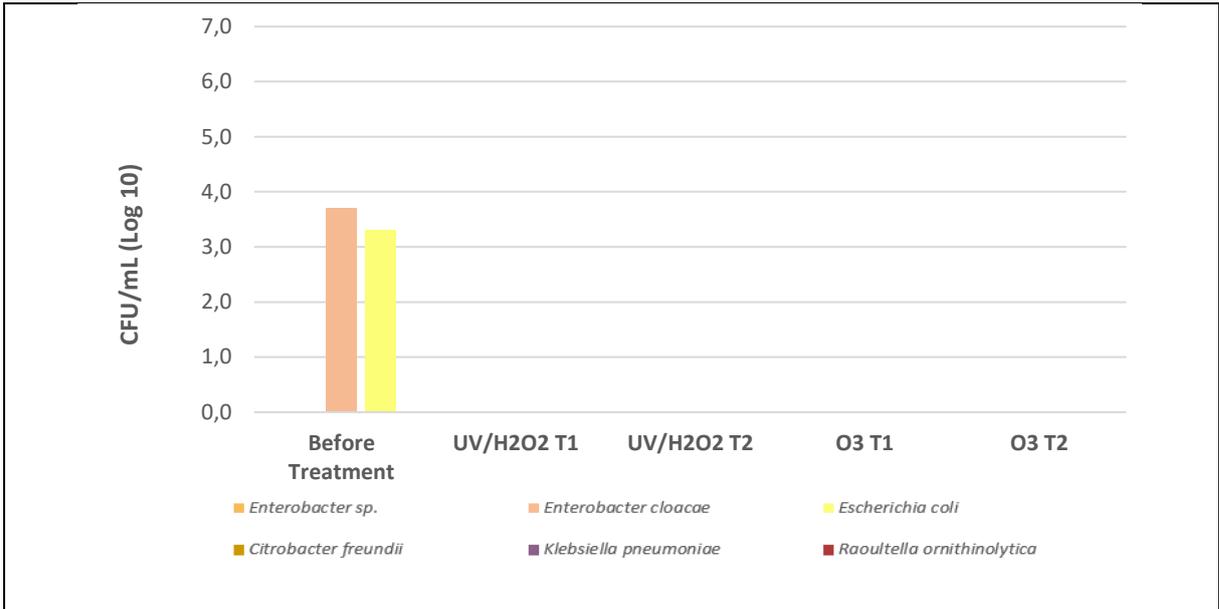
Regarding the *Citrobacter freundii*, a multidrug-resistant strain of this species was isolated from a wastewater treatment plant in China, and the data presented suggested that *C. freundii* strains derived from the environment may serve as potential sources of antibiotic-resistant genes (Jiang et al., 2019). *Enterobacterales* resistant to antibiotics and microbial agents (carbapenemase-producing *Enterobacterales* and 16S rRNA methylase-producing Gram-negative bacteria) are present in wastewater and may survive the treatment in WWTP, being released into the aquatic environment, thus posing an emerging threat to public health and environmental integrity (Zurfluh et al. 2017). Thus, it is essential to monitor the microorganisms present in the effluents of the WWTPs because they may contain multi-resistant strains. Nowadays, the microbiological quality of water is evaluated by the detection of fecal indicators, such as total coliforms, *E. coli*, *Clostridium perfringens* and enterococci, being focused mainly on the detection of *E. coli*. Standards and reference values for the microbiological quality of sites receiving treated wastewater are generally expressed in terms of the allowed number of fecal coliforms (Mara; Roran, 2003).

Figure 2A (rainy season) and 2B (dry season) present the microbiological characterization of two GW samples before and after AOP treatments. *E. coli* and *Enterobacter cloacae* were detected before the disinfection treatment in both collections while *C. freundii* was detected only in collection 1. When subjected to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> the GW sample had all the target microorganisms inactivated. However, ozonation of sampling 1 was not able to inactivate *C. freundii*, which was detected in ozonated samples in higher concentration than the untreated sample. It is interesting to point out that even with an ozone dose of 10 mg L<sup>-1</sup> (in O<sub>3</sub>T2) the inactivation of *C. freundii* was not reached (Figure 2A), showing that this oxidizing agent did not present an effective inactivation capacity for this species. The increase in *C. freundii* can be related to the absence of competition with other bacteria, which were inactivated during the treatment, therefore favoring its ability to form colonies and providing an increase in its amount in relation to the untreated sample.

Concerning UW, Figure 2C, 2D and 2E presents the biological characterization of the 3 collected samples before and after AOP treatments. The 3 samplings of UW presented different types of microorganisms since they were collected in different periods of the year. Collection 1 (Figure 2C) and 3 (Figure 2E) were carried out in the dry season and collection 2 (Figure 2D) was carried out in rainy season. *Klebsiella pneumoniae* was the bacteria found in effluents samples 1 and 2. In collection 1 there was the presence of *Enterobacter* sp. and *E. coli*.

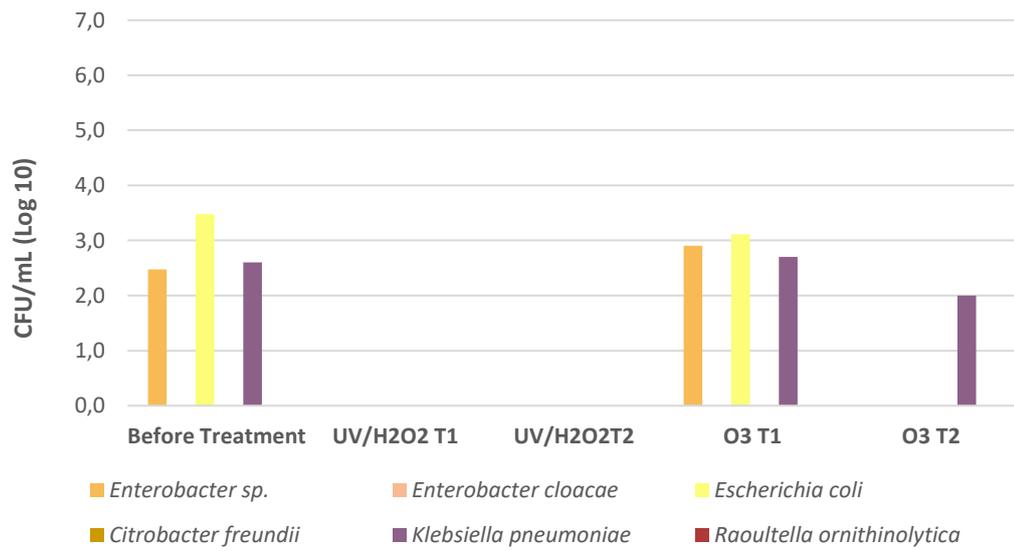
Collection 3 presented different microorganism when compared to the other samples of UW (*Enterobacter cloacae*, *C. freundii* and *Raoultella ornithinolytica*, formerly *Klebsiella ornithinolytica*). When UW was subjected to ozonation, the bacteria inactivation was similar to the GW sample, since all the microorganisms were inactivated in all the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment conditions (T1 and T2). In the case of ozone, the inactivation profile of UW was diverse depending of the sample. In Figure 2D it is possible to observe that *E. coli* was not detected in the row effluent. However, it appears after the first ozone dose (O<sub>3</sub>T1). This is a interesting fact because the absence of detection in the untreated samples does not mean that it was not present in the sample before the treatment. Nevertheless, its growth and potential to form colonies was greater in the sample after the ozone treatment (O<sub>3</sub>T1). In the same sampling (Figure 2D), the increase in ozone dose from 5 to 10 was able to inactivate both detected bacteria. The same behavior was observed in the first UW sampling (Figure 2C), since the higher ozone dose inactivate *Enterobacter* sp. and *E. coli*. 10 mg L<sup>-1</sup> of ozone was not able to inactivate the 2 target enterobacteria (*C. freundii* and *K. pneumoniae*), which have to be taken into account when the safety of ozone treated effluent are assessed. The third sampling of UW, which presented different microbiota, had the three enteric bacteria inactivated in all the applied ozone dose.





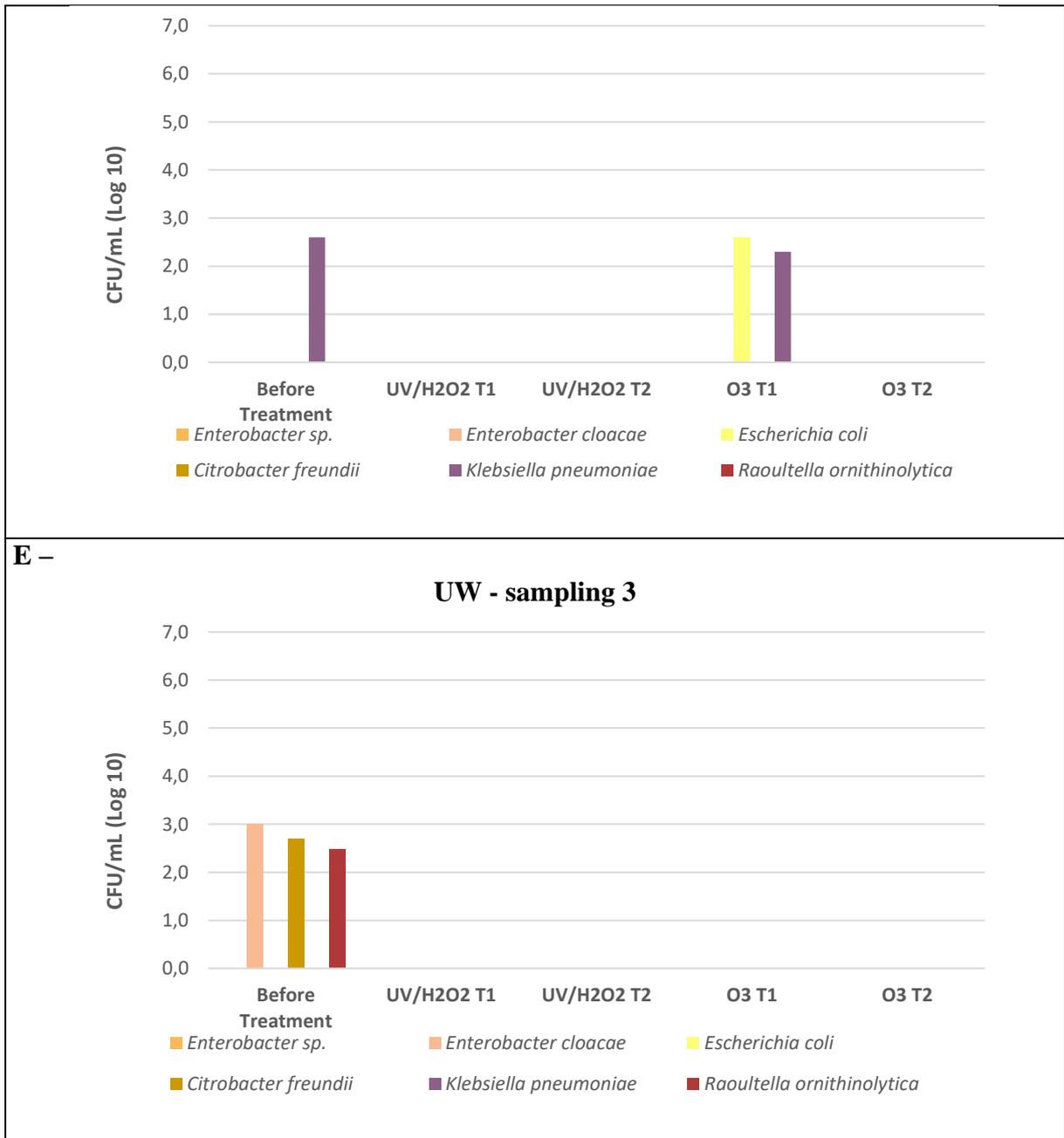
C –

**UW- sampling 1**



D –

**UW- sampling 2**



**Figure 2.** Enterobacteria presence during ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of secondary effluents. (a): GW first sampling; (b): GW second sampling ; (c): UW first sampling; (d): UW second sampling; (e): UW third sampling.

### 3.3.2 Non-fermenting gram negative bacteria and *Aeromonas*

Figure 3 shows the non-fermenting gram negative bacteria and *Aeromonas* found in the effluent samples before and after the treatments with AOP. In this set of results, it is possible to observe a great variation of the species found in the different samples as well as between samples before and after the treatments. However, some common bacteria were found, i.e. *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* and *Pseudomonas*. The genus *Pseudomonas* includes multiple

species with wide distribution in different environments. It can be found in surface water, lakes and rivers, however they are rarely found in drinking water (Kittinger et al., 2016).

All the gram negative bacteria found in the two GW samples were completely inactivated with the use of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figures 3A and 3B). However, their behavior after ozonation was different. The first GW sampling had not the number of bacteria reduced by the action of ozone. Instead, ozonation promoted the increase in the number of detected bacteria, which happened in both tested ozone doses. In this case, the bacteria *Acinetobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia complex* and *Moraxella* sp. were identified before the treatment (Figure 3A). After the ozonation, an increase in the amount of *Acinetobacter* sp. was observed along the treatment time. It should be noted that, for this bacteria, there was an increase in microorganisms from T1 to T2. There was a decrease in the growth of *B. cepacia complex* along the treatment time, however there was an insignificant increase in these bacteria from T1 to T2. The others two species present in the first sampling of GW (*A. hydrophila* and *Moraxella* sp.) were completely inactivated with the use of ozone. However, the ozonation of GW promoted the growth of other species such as *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* and *Shewanella putrefaciens*. Moreover, the reduction of competition due to previous bacteria inactivation, the identification of other types of bacteria might be due to the fact that oxidation processes can generate assimilable organic carbon (AOC), thus increasing the overall bacterial growth potential of a water (Hammes et al., 2006; Van der Kooij, 1992). Vital et al., (2010) found that the ozonation generated AOC and led to an increased growth potential of *P. aeruginosa*. Furthermore, immobilized cells may show genetic changes, which increase their growth rate, metabolic activity and resistance to toxic compounds (Shuler and Kargi, 2002).

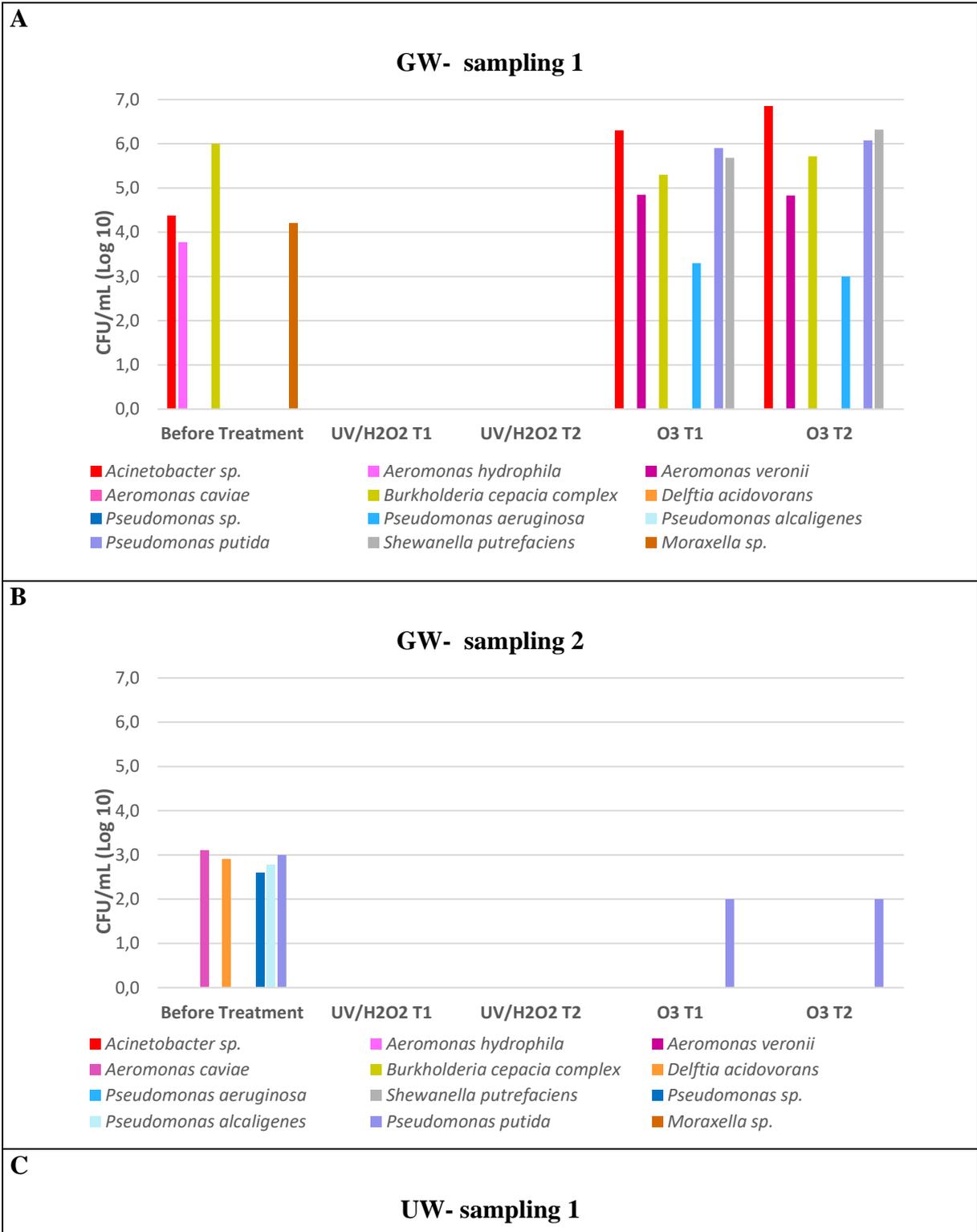
In the second GW collection presented in Figure 3B, the bacteria *Aeromonas caviae*, *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas alcaligenes* and *P. putida* were identified before the treatment. In this case, the majority of the bacteria was inactivated with both ozone dose, except *P. putida*, which was resistant to ozonation and was present after ozonation, even in the higher ozone dose.

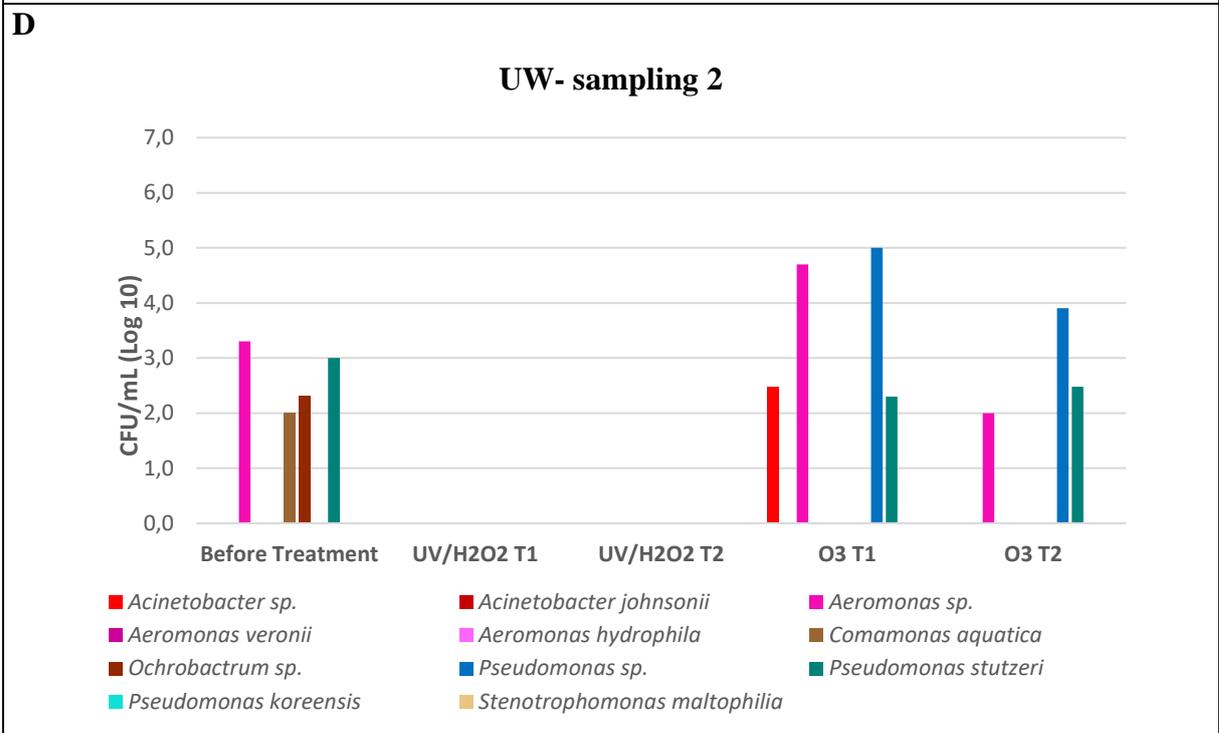
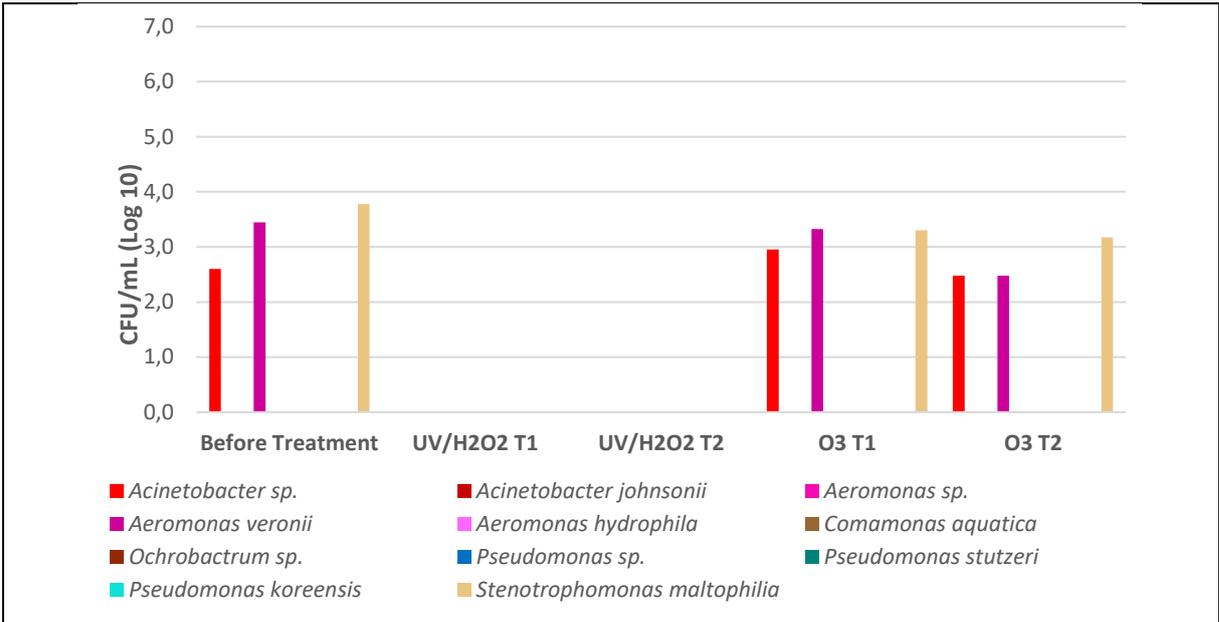
Non-fermenting gram negative bacteria and *Aeromonas* also show ozone resistance in UW samples. Figures 3C, 3D and 3E shows that ozonation was not able to completely inactivate all the bacteria. In the first UW sampling *Acinetobacter* sp., *Aeromonas veronii* and *Stenotrophomonas maltophilia* were identified before and after ozonation regardless the applied ozone dose (Figure 3C). In the second UW sampling *Aeromonas* sp., *Comamonas aquatica*, *Ochrobactrum* sp., *Pseudomonas stutzeri* were identified in the untreated sample (Figure 3D).

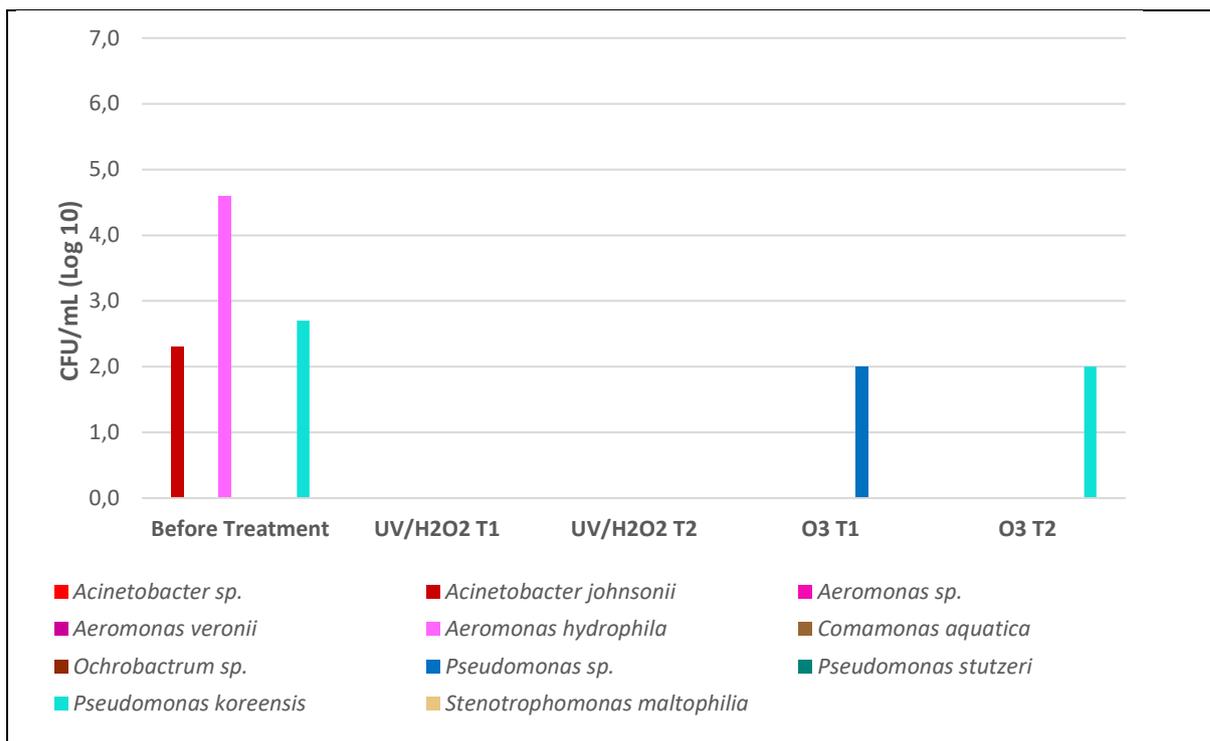
After ozonation an increase in the amount of *Aeromonas* sp. can be observed along with the persistence of *P. stutzeri* in the ozonated samples. Other bacteria also grew after ozonation, such as *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. The inactivation profile promoted by ozonation is the same for the both sampling. In the third collection presented in Figure 3E the inactivation of *Acinetobacter johnsonii* and *Aeromonas hydrophila* was observed. However, the ozonation promoted the growth of *Pseudomonas* sp. in T1 and *Pseudomonas koreensis* in T2.

The great resistance of gram negative non fermenting bacteria and *Aeromonas* toward ozonation in this study is a fact of concern because some of the target bacteria are important species for human pathology such as *P. aeruginosa*, which causes severe infections in immunosuppressed patients, especially in the hospital environment, leading to high morbidity and mortality (Fariñas; Martínez- Martínez, 2013). These bacteria are able to survive in environments with high and low nutritional conditions (Mena; Gerba, 2009). From the public health, the presence of the genus *Aeromonas* in the effluent sample may be worrying as this bacteria may be associated with important human diseases (Jin et al., 2018).

According to Ribas et al. (2000) the regrowth potential of microorganisms in distribution systems is better qualified by the amount of *Pseudomonas* spp., since this group is considered a more adequate indicator than the usual fecal bacteria. This is also corroborated in our results, in which the *Pseudomonas* bacteria were still present in treated samples where *E. coli* had already been inactivated. Thus, if the evaluation of disinfection is based only on fecal parameters such as the use of the *E. coli*, other gram negative bacteria might be present in the produced effluent.







**Figure 3.** Gram Negative non-fermenting bacteria and *Aeromonas* spp. during ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of secondary effluents. (a): GW first sampling; (b): GW second sampling; (c): UW first sampling; (d): UW second sampling; (e): UW third sampling.

### 3.3.3 Gram positive bacteria

Gram positive bacteria, mostly of the *Bacillus* genus (spore-forming gram positive bacilli) demonstrated to be resistant to ozone and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disinfection without the precision of the species. Concerning the two GW samples collected for this study, the first sample did not show gram positive bacteria in the untreated sample. However, after UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, *Bacillus* sp. was present in the treated effluent (Figure 4A). In the second collection (Figure 4B), *Bacillus megaterium* and *Bacillus arsenicus* were identified in the untreated samples. Nevertheless both UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozonation promoted grow of other bacteria such as *Lysinibacillus boronitolerans*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *Bacillus indicus* and *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis* and *Bacillus simplex*. The inactivation of the initial microorganism was not observed for any sample, indicating that for this group of microorganism the AOP were not effective and additionally promoted the growth of additional bacteria.

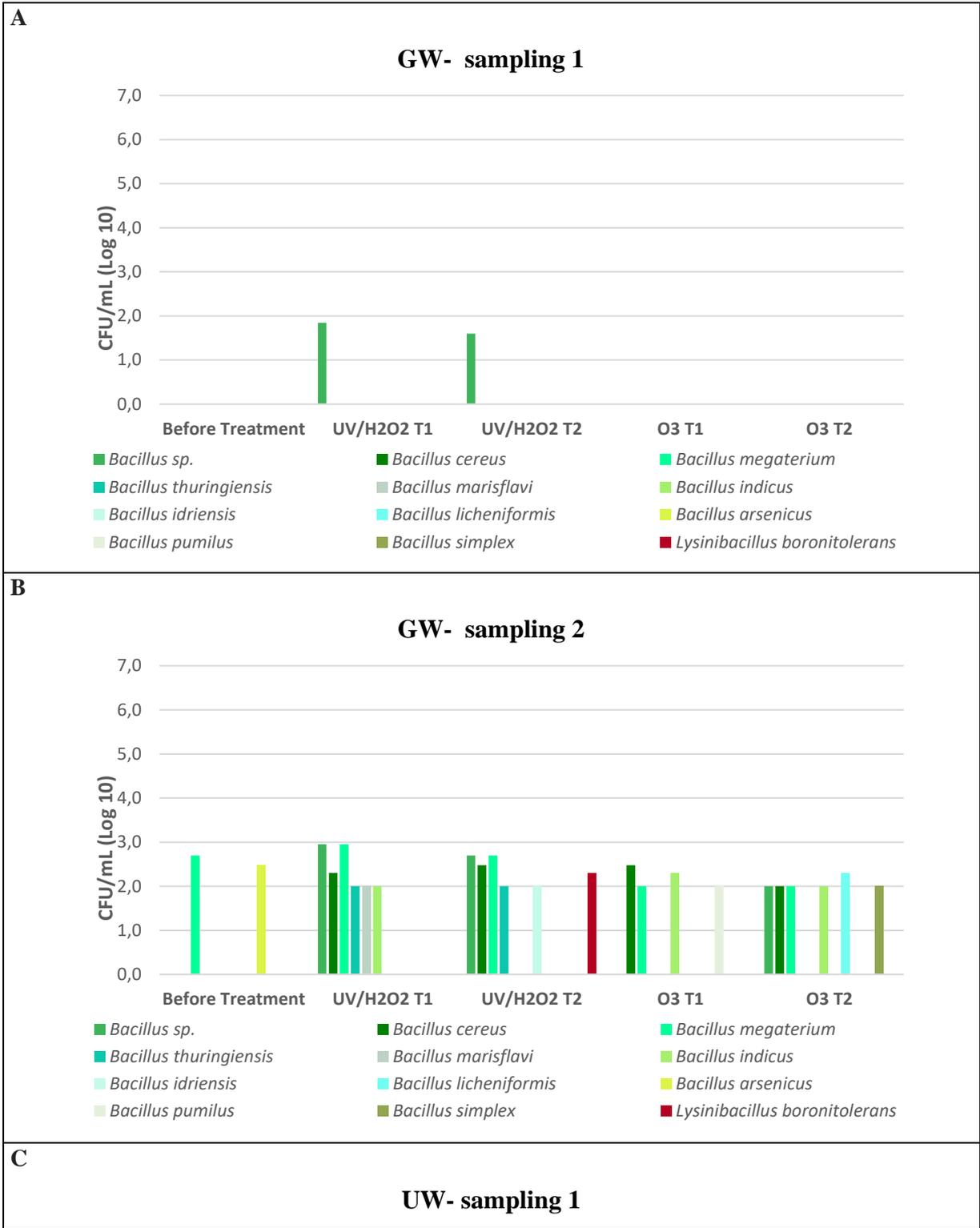
The large number of species that emerged after the treatments could come from the fact that these bacteria are mandatory or facultative aerobic (Turnbull, 1996) and the GW effluent is characterized by having a high organic load, which means that, with both treatments

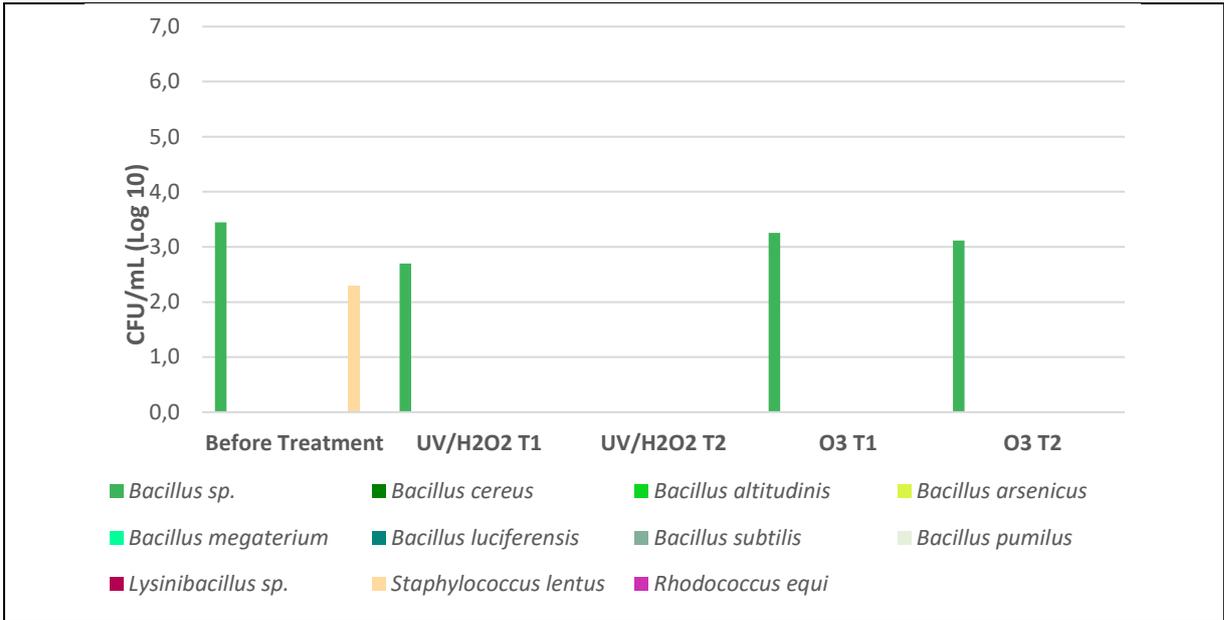
it increases the degradation of the organic matter in AOC and increases the oxygen content in the samples, causing the proper environment creation for multiplication. In addition, the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was harmed because these species produce catalase (Turnbull, 1996) and it can quench the residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thus increasing the chances of their multiplication.

The set of experiments carried out with UW confirmed the resistance of gram positive bacteria for AOP disinfection. The first UW sample characterization (Figure 4C) presented *Bacillus* sp. and *Staphylococcus lentus*. The disinfection profile show *Bacillus* sp. still present in almost all the treated effluents. In the second collection (Figure 4D) only presented *Bacillus* sp. as gram positive bacteria. Nevertheless, both UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozonation were ineffective to inactivate this genus. Therefore, a similar profile can be observed in both samples.

Regarding the third UW collection presented in Figure 4E, *Bacillus cereus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus luciferensis* and *Bacillus* sp. were found in the samples before the treatment. In this case, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozonation were ineffective to inactivate the gram positive bacteria. When subjected to ozonation the third UW sample still presented *B. cereus*, *B. subtilis* and *Rhodococcus equi* while after the higher ozone dose *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. luciferensis*, *B. subtilis* and *B. pumilus* were identified. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated samples presented *Bacillus* sp., *B. subtilis* and *Lysinibacillus* sp. and even increasing the treatment time the growth of *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. arsenicus* and *B. megaterium* were observed. The microorganisms *B. cereus* and *B. megaterium* were the ones that presented greater resistance to both treatments.

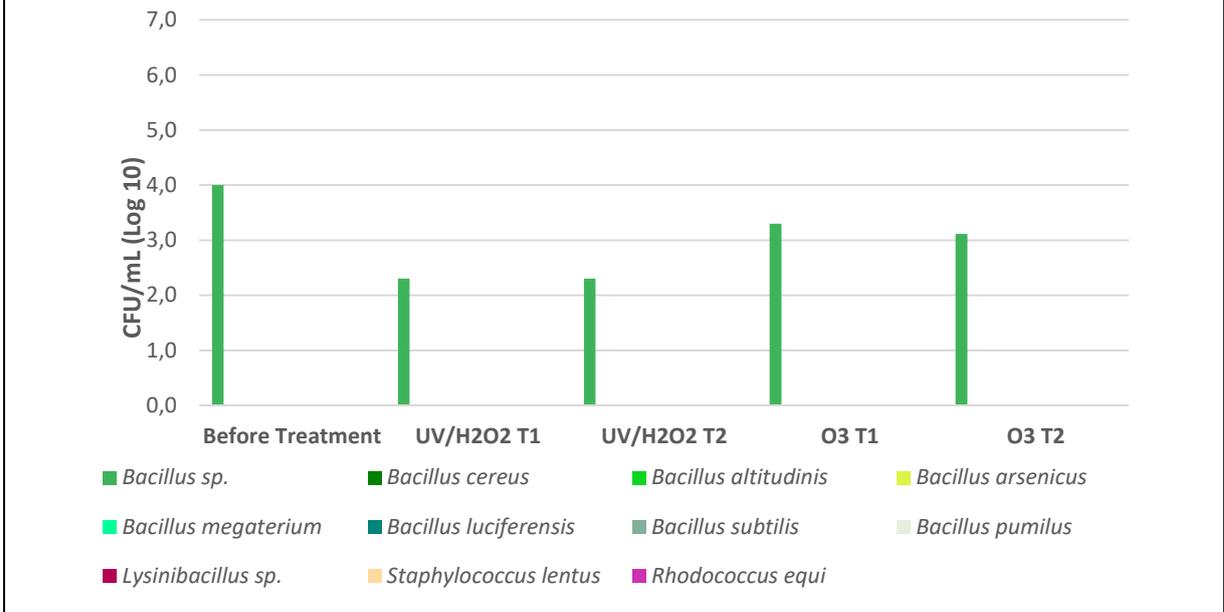
One of the probable causes of the persistence of *B. cereus* and *B. megaterium* may be related to the fact that these bacteria survive several environmental conditions, due to its ability to form spores, which are resistant to different temperatures, wide range of pH, dehydration, irradiation and chemical agents (Granun and Lund, 1997; Brock et al., 2000). With the return of favorable environmental conditions, spores can easily convert into vegetative cells through the germination process (Elhariry, 2011). One of the basic strategies by *B. megaterium* to survive in conditions of stress is the maintenance of the cell wall/membrane integrity. The cell wall, made up of peptidoglycan, protects the cell against lysis due to the osmotic pressure and maintains cell shape, besides that may remodel its membrane structure for maintaining membrane integrity (Typas et al., 2011).





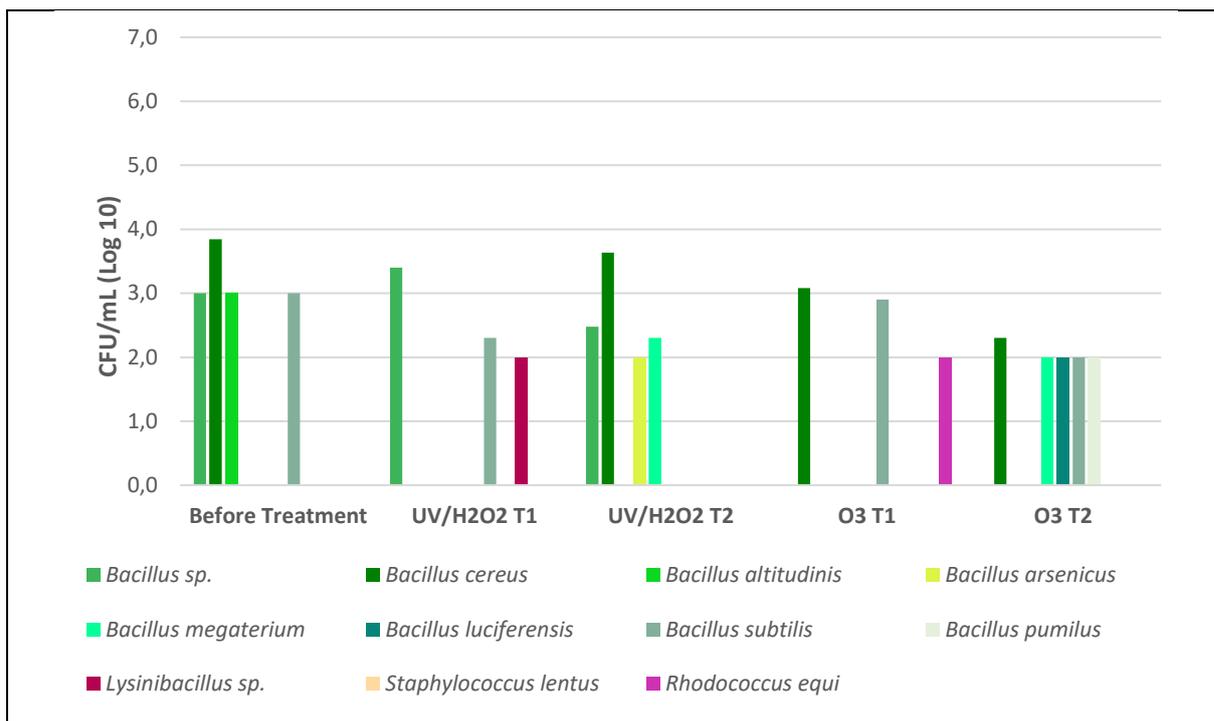
**D**

**UW- sampling 2**



**E**

**UW- sampling 3**



**Figure 4.** Gram Positive bacteria during ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of secondary effluents. (a): GW first sampling; (b): GW second sampling; (c): UW first sampling; (d): UW second sampling; (e): UW third sampling.

*Bacillus*, belonging to gram-positive bacteria, were generally one of the most resistant microorganisms found in the samples, being identified after both disinfection treatments (ozonation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Some photocatalytic inactivation studies report greater resistance of gram-positive bacteria than gram-negative bacteria, due to a thicker cell wall, therefore, a greater amount of hydroxyl radical attacks is necessary for gram-positive bacteria in order to obtain complete bacterial inactivation (Rincón, Pulgarin, 2005; Chung et al., 2009; Gomes, Vilar, Boaventura, 2009).

As can be observed in this study, there was a difference in the disinfection process depending on the observed microorganism, in the case of *E. coli* there was a bactericide effect in the processes with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and when ozonation was applied for a longer time (40 minutes). For *Bacillus*, it was possible to observe their growth in practically all treatments (except for some collections). The basis for these differences in the disinfection processes can be attributed to the structure and biochemical characteristics of the bacteria, which will influence their sensitivity to disinfection methods (Rincón, Pulgarin, 2005).

Although there are many studies on AOPs, the vast majority refer to the removal of microcontaminants and the influence of constituents of effluents in this removal (Souza et al.,

2014). However, the effectiveness of these processes, as regards the elimination of microorganisms from effluents, is restricted to a few species, such as *E. coli*. As the inactivation of microorganisms is related to the radicals generated, it is extremely important that further studies are carried out to assess the interference of these components present in wastewater (Malvestiti; Dantas, 2018), as they can directly influence the disinfection process. Therefore, in view of the studies presented here, there is a question about the use of *E. coli* as one of the main microbial indicators to monitor the effectiveness of disinfection in advanced oxidative processes, since it has been shown to be more sensitive to disinfection processes than other microorganisms.

As seen in the results of microbiological analyzes, in general, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was more efficient in inactivating the targeted microorganisms than ozonation. Ozonation destroys pathogens by lipid oxidation and/or by damage to the pyrimidic and puric bases of nucleic acids (GEHR et al., 2003). UV radiation, depending on exposure time and dose used, alters DNA and RNA and/or may damage the cell membrane of the pathogen (BRAUNSTEIN et al., 1996). The antimicrobial activity of hydrogen peroxide is related to the generation of radicals, such as singlet oxygen, superoxide, and hydroxyl radicals, which cause permanent damage to cellular components, such as enzymes, membrane components and nucleic acids (KSIBI, 2006). This may be the result of the interaction of some substances present in the effluent samples, after the ozone treatment, which impairs the process of free radical formation, or due to the applied ozone doses not being sufficiently effective for the complete disinfection of these effluents. These results corroborate those found by Malvestiti and Dantas (2018), in which the ozone treatment was the least efficient for the disinfection process of the studied samples.

The effluent disinfection process is a very important step in the effluent treatment process, so that these effluents do not present high loads of pathogens, which could impact water resources, as well as human health, if these effluents are reused.

### **3.4 Human health and environmental implication**

In the present study, AOP treatments usually used to wastewater disinfection and well-known to be effective to inactivate *E. coli* and total coliforms were not efficient to inactivate many classes of bacteria. In some of the experiments, the oxidation of the sample allowed the growth of species that had not been identified before, as well as those bacteria remaining from the previous phases. This fact shows the importance of microbiological evaluation when the aim of the wastewater treatment is the wastewater reuse.

If the proposed treatment is not adequate, residual pollutants and several microorganisms can be released by WWTP effluents and present deleterious impact (Manai et al., 2018), thus generating possible risks to human health and the aquatic ecosystem (Marti; Jofre; Balcazar, 2013; Miao et al., 2004; Michael et al., 2013). Treated effluents can release bacteria from humans into the environment, including potential pathogens that have survived to treatment processes, which can grow and proliferate in the environment due to favorable microbiome (Numberger et al., 2019).

Wastewater effluents also contain several substances, including antibiotics, biocides and metals (Ju et al. 2019), which can generate resistance to the microorganisms present there. Currently, there is additional concern due to the increased use of antibiotics and antibacterial products in the treatment and prevention of COVID-19 disease that may further stimulate microbial resistance (Usman et al., 2020). This may have direct consequences on WWTP generated effluents. Approximately 50-90% of the antibiotics consumed are excreted in the urine or feces of humans or animals, either in their original formulation, partially degraded or as metabolites. Thus, WWTP are identified as hotspots for the spread of bacterial resistance in the environment (Gallert et al., 2005; Ju et al. 2019; Michael et al., 2013). In addition, the presence of antibiotic-resistant bacteria also increases the risk of transferring genes to non-resistant bacteria (Bennet, 2008). Resistance genes eventually inserted into mobile genetic platforms (plasmids, transposons, integrons), are able to spread between the bacterial communities of water and soil (Alonso; Sanches; Martinez, 2001).

Antibiotic-resistant bacteria are responsible for thousands of deaths in the USA and Europe, worsening in low and middle income countries, where the high disease burden is associated with the emergence and spread of microbial resistance (O'neil, 2016). In 2017, the World Health Organization (WHO) published a list of "priority pathogens" resistant to antibiotics, in which it identified 12 families of bacteria that pose human health risks. In this list, there are present carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacterales*, classified as "Priority 1: Critical" (OMS, 2017). In our study, we identified the genus *Acinetobacter*, as well as the species *P. aeruginosa* even after application of ozonation. Although tests have not been carried out to check the antibiotic resistance of these organisms, there is a warning about their presence in the treated effluents.

Many researchers have reported the presence of resistance genes and antibiotic-resistant bacteria in wastewater samples (Zhang et al., 2009; Auerbach et al., 2007; Brooks et al., 2007; Pruden et al., 2006). Table 4 shows the genera of bacteria found in our study even after the

application of AOP and relates these genera to resistance (antibiotic and metals) described in the literature.

**Table 4.** Genera of pathogens that survived the advanced oxidative treatments studied here, being related to some of type resistance described in the literature.

Genus	Survival in AOP	Resistance related in the literature	Type of samples studied	Reference
<i>Acinetobacter</i>	O <sub>3</sub>	Antibiotics resistance (trimethoprim, rifampin, chloramphenicol, amoxicillin/clavulanic, sulfisoxazole, ciprofloxacin)	Urban WWTP USA	Zhang et al., 2009
		Antibiotics resistance (ampicillin, gentamicin, tetracycline and multi-resistance)	Urban WWTP in Danish	Guardabassi et al., 2002
<i>Aeromonas</i>	O <sub>3</sub>	Antibiotics resistance (ceftriaxone, carbapenems, ciprofloxacin and multi-resistant)	Collection from the WWTP in Colombia	Rodríguez et al., 2020
		Antibiotics resistance (ceftazidime, meropenem, nalidixic acid)	Drinking and waste water treatment plants in Portugal	Figueira et al., 2011
		Antibiotics resistance (Beta-lactams resistance, tetracyclines and aminoglycosides)	Treated wastewater and samples of river water collected upstream and downstream of WWTP	Harnisz; Korzeniewska, 2018
<i>Bacillus</i>	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and O <sub>3</sub>	Resistant to metals - As(III), As(V), Cr, Co, Cu, Cd, Hg, Ni, Pb, Se, and Zn	Soil samples collected from WWTP in Pakistan	Shafique et al., 2017
		Antibiotics resistance (amoxicillin, chloramphenicol, erythromycin, vancomycin)	University WWTP in Brazil	Paes et al., 2012
<i>Citrobacter</i>	O <sub>3</sub>	Ciprofloxacin resistant	WWTP in Canadian	Yim et al., 2012
		Quinolone resistant	WWTP in Italy	Forcella et al., 2013
<i>Enterobacter</i>	O <sub>3</sub>	Antibiotics resistance (Amoxicillin, ticarcillin, nalidixic acid, pefloxacin, tobramycin, netilmicin and tetracyclin)	Hospital effluent in French	Barraud et al., 2013
<i>Klebsiella</i>	O <sub>3</sub>	Antibiotics resistance (tetracycline, amoxicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, cephalothin, ciprofloxacin)	Urban WWTP in Portugal	Ferreira da Silva et al., 2007
		Fluoroquinolone resistance	Municipal WWTP in the Czech Republic	Dolejska et al., 2011
		Antibiotics resistance	Collection from the WWTP in Germany	Lüddecke et al., 2015

		Antibiotics resistance (ampicillin streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, ciprofloxacin, ceftazidime)	Urban WWTP in Ireland	Galvin et al., 2010
<i>Pseudomonas</i>	O <sub>3</sub>	Antibiotics resistance (meropenem;piperacillin/tazobactam; ceftazidime and multi-resistant)	Danubio river	Kittinger et al., 2016
		Antibiotics resistance (vancomycin; imipenem)	Wastewater before and after ozone treatment	Alexander et al., 2016

Ju and collaborators (2019) demonstrated that the amounts of resistant bacteria and genes released by WWTP into the environment are strongly related to the remaining bacterial biomass in the final effluent. These authors reported the spread of resistance genes in bacteria of the genus *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, genera also identified in the present study. Therefore, any measure that substantially reduces bacterial biomass in the discharged effluent would reduce the discharge of resistance genes into the environment. As shown in table 4, many genera present in the treated effluents could present some types of resistance-related in the literature, despite not being directly the object of this study.

Water represents a vehicle for the transmission of diseases caused by pathogenic microorganisms, waterborne diseases, becoming a risk to the health and well-being of the population (Moura; Assumpção; Bischoff, 2009). In this way, the analysis of the microbiota present in the effluents provide important information about the types of pathogens that can be found there. On the other hand, all organisms present in the WWTP microbiome are associated with diseases, some of which are commonly found in the environment. Shafique et al. (2017) identified metal-resistant bacteria isolated from a WWTP in Pakistan that had dual oxidation or reduction capacity and aided in plant growth, such bacteria can be important tools for remediation of sites contaminated with metals.

The identification of microorganisms present in the final effluents is an important tool for estimating possible environmental and health risks, in addition to verifying the efficiency of the applied disinfection processes. Despite the growing scientific evidence, existing regulations and policies need to adapt and determine the permitted levels of these microorganisms in the environment, to protect public health and environmental quality. In this regard, it is important to consider technologies for the prevention and treatment of effluents to minimize the potentially harmful impact resulting from the release of microorganisms in aquatic environments. Therefore, optimizing and improving wastewater treatment processes and the quality of the final effluent is an essential step in protecting the aquatic environment, and

consequently for human health. Additional modifications or combinations of processes should be studied to increase the bactericidal effect and improve the sanitation of sanitary effluents.

#### 4. Conclusions

The present research was able to provide complementary results to the microbial analysis of *E. coli* from wastewater, both before and after the disinfection process. In addition, it was observed that treatment with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seems to be more efficient in the disinfection process than ozone.

In both WWTPs, the microorganisms *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* and *Pseudomonas* were found even after the process of disinfection with ozone. And the *Bacillus* genus was the most resistant microorganism found. The use of *E. coli* as a bioindicator for the quality of wastewater effluents may not be adequate, since this microorganism was more sensitive to the oxidative treatments tested.

The detailed identification of the microbial population in the wastewater effluent results in better water management, since it is possible to evaluate the potential pathogens present there. In addition, in future work it is also important to evaluate microbial resistance genes in bacteria surviving advanced oxidative treatments in order to prevent and monitor any microorganism that may cause public health problems.

#### 5. Acknowledgements

This work was supported by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) [460962/2014-0] and [308914/2017-1], and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [2016/22483-1] and [2014/17774-1].

#### 6. References

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p.5575–5599, 2016. DOI 10.1099/ijsem.0.001485

ALAM, M.Z.M.; OHGAKI S. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in producing the residual effect of ultraviolet radiation. **Water Environ. Res.**, v. 74, n.3, p. 248–255, 2002.

ALEXANDER, J. et al. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. **Sci. of the Total Environ.**, v. 559, p. 103–112, 2016.

ALKAN U. et al. Efficiency of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process for the disinfection of humic surface waters. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 42, n.4, p. 497-506, 2007. DOI: 10.1080/10934520601188375

ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental microbiology**, v.3, n.1, 1-9, 2001.

AMINHARATI, F. et al. *Citrobacter freundii* foodborne disease outbreaks related to environmental conditions in Yazd Province, Iran. **Iranian journal of public health**, v. 48, n. 6, p. 1099, 2019.

AN, X. L. Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR. **Environ. Int.**, v. 117, p. 146-153, 2018.

ANTONIOU, M. G. et al. Required Ozone Doses for Removing Pharmaceuticals from Wastewater Effluents. **Science of the Total Environment**, v. 42, n. 9, p. 456–457, 2013. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.072.

ARISTIZÁBAL-HOYOS, A. M. et al. High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. **J. of Environ. Managem.**, v. 245, p. 37-47, 2019.

AUERBACH, E. A.; SEYFRIED, E. E.; MCMAHON, K. D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. **Water research**, v. 41, n.5, p.1143-1151, 2007.

BARRAUD, O. et al. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n. 7, p. E306-E308, 2013.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **Br. J. Pharmacol**, v.153, p.S347–S357, 2008.

BITTON, G. 2005. **Wastewater Microbiology**, 3rd ed. Hoboken, New Jersey: **John Wiley & Sons**.

BRAUNSTEIN, J.L. et al. Ultraviolet disinfection of filtered activated sludge effluent for reuse applications. **Water Environ. Res.**, v. 68, p. 152–161, 1996.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. New Jersey: Madigan, Michael T Martinko, Jhon M Parker, Jack, 9 ed. Biology of Microorganisms, P.H.I. Inc. 2000.

BROOKS, J. P. et al. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 616-622, 2007.

BUELOW, E. et al. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 7, 2018.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 115-118, 1950.

CAI, L.; JU, F.; ZHANG, T. Tracking human sewage microbiome in a municipal wastewater treatment plant. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, p. 3317-3326, 2014.

CAI, L.; ZHANG, T. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. **Environ Sci Technol.**, v. 47, n. 10, p. 5433-5441, 2013.

CAVALLINI, G. S. et al. Use of peracetic acid in sanitary sewage disinfection: a review. **Semina:**

**Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, n.1, p. 27-40, 2012.

CIAGRO. 2020. Climatological data. Available in: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QTmedPeriodo.asp>. Acess: jun/2020.

CHANG Y. T. et al. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. **Front. Microbiol.** v. 6, p. 893, 2015.

CHUNG, C. J. et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. **Surface and coatings technology**, v. 203, n.8, p. 1081-1085, 2009.

DANTAS, R.F. et al. Assessment of Cationic Surfactants Mineralization by Ozonation and Photo-Fenton Process. **Water Environ. Res.**, v. 81, n. 2, p. 201-205, 2009.

DENTINI, P. et al. Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis in a Brazilian reference center. **Med Microbiol Immunol**, v. 206, p. 447–461, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0521-2>

DICKIN, S. K. et al. A Review of health risks and pathways for exposure to wastewater use in agriculture. **Environmental health perspectives**, v. 124, n.7, p. 900-909, 2016.

DOLEJSKA, M. et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. **J. of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n.12, p. 2784-2790, 2011.

EPRS. European Parliamentary Research Service. 2020. Water reuse: setting minimum requirements. EPRS BRI(2018)625171\_EN, 2018.

ELHARIRY H M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1266-1274, 2011.

ETCHEPARE, R. et al. Application of flocculation-flotation followed by ozonation in vehicle wash wastewater treatment/disinfection and water reclamation. **Desalination and Water Treatment**, v. 56, p. 1728-1736, 2014.

FARIÑAS, M. C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Multiresistant Gram-negative bacterial infections: Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 31, n.6, p. 402-409, 2013.

FERREIRA DA SILVA, M. et al. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban waste water treatment plant. **FEMS Microbiol Ecol**, v.60, p. 166-176, 2007.

FIGUEIRA, V. et al. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. **Water research**, v. 45, n.17, p. 5599-5611, 2011.

FORCELLA, C. et al. Qnr B9 in Association with TEM-116 Extended-Spectrum Beta-Lactamase in *Citrobacter freundii* Isolated from Sewage Effluent: First Report from Italy. **Journal of Chemotherapy**, v. 22, n.4, p. 243-245, 2010.

FORSTER, D. H.; DASCHNER, F. D. *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. **EUR. J. Clin. Microbiol. Infectar. Dis.**, v. 17, p. 73-77, 1998.

GALLERT, C.; FUND, K.; WINTER, J. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n.1, p.106-112, 2005.

- GALVIN, S. et al. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n.14, p.4772-4779, 2010.
- GEHR, R.; WAGNER, M.; VEERASUBRAMANIAN, P. PAYMENT. Disinfection efficiency of peracetic acid: UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. **Water Res.**, v. 37, p. 4573–4586, 2003.
- GOMES, A. I.; VILAR, V. J.; BOAVENTURA, R. A. Synthetic and natural waters disinfection using natural solar radiation in a pilot plant with CPCs. **Catalysis today**, v. 144, p. 55-61, 2009.
- GONÇALVES, R.F; JORDÃO, E. P.; SOBRINHO, P.A. Introdução. In: GONÇALVES, R. F. (Coord). Projeto PROSAB: Desinfecção de efluentes sanitários. Rio de Janeiro: ABES, RiMA, 2003. p.1-26.
- GRANUN P. E.; LUND T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223-228, 1997.
- GUARDABASSI, L.; LO FO WONG, D.M.A.; DALSGAARD, A. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. **Water Res**, v. 36, p. 1955-1964, 2002.
- GURTLER, J. B.; BEUCHAT, L. R. Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and ecometric techniques. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 7661–7669, 2005.
- HAM, J. H.; MELANSON, R.A.; RUSH, M. C. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 4, p. 329-339, 2011.
- HAMMES, F. et al. Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. **Water Res.** v. 40, p. 2275-2286, 2006.
- HARNISZ, M.; KORZENIEWSKA, E. The prevalence of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. in the municipal wastewater system and their dissemination in the environment. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 377-383, 2018.
- HONG, P. Y. et al. Reusing treated wastewater: consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes. **Water**, v. 10, n. 3, p. 244, 2018.
- JEREMIC, S.; JAKIC-DIMIC, D.; VELJOVIC, L. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. **Acta Vet.**, v. 53, p. 399-410, 2003.
- JIANG, X. et al. Genetic characterization of a novel sequence type of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* strain recovered from wastewater treatment plant. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2775, 2019.
- JIMÉNEZ, B., DRECHSEL, P., KONÉ, D., BAHRI, A., RASCHID-SALLY, L., AND QADIR, M. 2010. Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: An overview. In: P. Drechsel, C.A. Scott, L. Raschid-Sally, M. Redwood and A. Bahri (eds.), *Wastewater Irrigation and Health: Assessing and Mitigating Risks in Low-Income Countries*. Earthscan-International Development Research Centre (IDRC)-International Water Management Institute (IWMI), London, UK, 3–27, 2010.
- JIN, D. et al. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. **Scientific reports**, v.8, n.1, p. 1-9, 2018.

- JU, F. et al. Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years. **Environ Microbiol Rep**, v.6, p. 80-89, 2014.
- JU, F. et al. Wastewater treatment plant resistomes are shaped by bacterial composition, genetic exchange, and upregulated expression in the effluent microbiomes. **The ISME journal**, v. 13, p. 346-360, 2019.
- KIRK, L. A. et al. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment Works. **Environ. Toxic. and Chem.: An Intern. J.**, v. 21, n. 5, p. 972-979, 2002.
- KITTINGER, C. et al. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the river Danube. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 586, 2016.
- KSIBI, M. Chemical oxidation with hydrogen peroxide for domestic wastewater treatment. **Chem. Eng. J.**, v. 119, p. 161–165, 2006.
- LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. **Medicine**, v. 80, p. 113–122, 2001.
- LAZAROVA V, B. et al. Role of water reuse for enhancing integrated water management in Europe and Mediterranean countries, **Water Science and Technology**, v. 43, p. 25-33, 2001.
- LEVINE, A. D.; ASANO, T. Peer reviewed: recovering sustainable water from wastewater. **Environ. Sci. and Technol.**, v. 38, n. 11, p. 201A-2008A, 2004.
- LIBERTI L. et al. Comparison of advanced disinfecting methods for municipal wastewater reuse in agriculture. *Water Sci Technol*, v.42, p. 215–220, 2000. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0316>
- LICCIARDELLO, F. et al. Wastewater tertiary treatment options to match reuse standards in agriculture. **Agricultural water management**, v. 210, p. 232-242, 2018.
- LOEB, B.L. et al. Worldwide ozone capacity for treatment of drinking water and wastewater: a review. **Ozone Sci. Eng.**, v. 34, 1, p. 64–77, 2012.
- LUBELLO C.; CARETTI C.; GORI R. Comparison between PAA/UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV disinfection for wastewater reuse. *Water Supply*, v.2, n.1, p. 205–212, 2002. doi: <https://doi.org/10.2166/ws.2002.0025>.
- LÜDDEKE, F. et al. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. **Water research**, v. 69, p. 243-251, 2015.
- LUNA, C. M.; ARUJ, P. K. Nosocomial acinetobacter pneumonia. **Respirology**, v. 12, n. 6, p. 787-791, 2007.
- MALVESTITI, J.A.; DANTAS, R F. Disinfection of secondary effluents by O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Influence of carbonate, nitrate, industrial contaminants and regrowth. **J. of Environ. Chemical Engineer**, v. 6, n. 1, p. 560-567, 2018.
- MALVESTITI J.A. et al. Optimization of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone wastewater treatment by the experimental design methodology. **Environmental Technology**, v.40, n.15, p. 1910-1922, 2019. DOI:10.1080/09593330.2018.1432698
- MANAIA, C. M. et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. **Environ. Int.**, v. 115, p. 312-324, 2018.

- MARA, D.; HORAN, N. J. (Ed.). Handbook of water and wastewater microbiology. Elsevier, 2003.
- MARTI, E.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J. L. Prevalence of Antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. 4, p. 1-15, 2018.
- MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 201, p. 71–115, 2009.
- MENESES, A.; PASQUALINO, J.C.; CASTELLS, F. Environmental assessment of urban wastewater reuse: Treatment alternatives and applications. **Chemosphere**, v. 81, p.266-272, 2010.
- MIAO, X.S. et al. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. **Environ. Sci. Technol.** v. 38, p.3533–3541, 2004.
- MICHAEL, I. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. **Water research**, v. 47, n.3, p.957-995, 2013.
- MILLER, G. W. Integrated concepts in water reuse: managing global water needs. *Desalination*, v. 187, p. 65–75, 2006.
- MORRIS, L. et al. Municipal wastewater effluent licensing: A global perspective and recommendations for best practice. **Science. of The Total Environ.**, v.580, p. 1327-1339, 2017.
- MOURA, A. C.; ASSUMPÇÃO, R. A. B.; BISCHOFF, J. Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 17-22, 2009.
- NASCIMENTO, T. et al. **International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters.** **Sci. Total Environ.**, v. 598, p. 910-915, 2017.
- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252-275, 2017.
- NOGUEIRA, R.F.P.; OLIVEIRA, M.C.; PATERLINI, W.C. Simple and fast spectrophotometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, p. 86-91, 2005.
- NUMBERGER, D. et al. Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. **Scientific reports**, v.9, n.1, p.1-14, 2019.
- O'NEIL, J. Amr review. The review on antimicrobial resistance, tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations, May 2016. [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf). Acessado em 18 de Setembro de 2020.
- OKOH, A.I. et al. Wastewater treatment plants as a source of microbial pathogens in receiving watersheds. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 6, n.25, p.2932–2944, 2007.
- OSUNMAKINDE, C. O. et al. Profiling bacterial diversity and potential pathogens in wastewater treatment plants using high-throughput sequencing analysis. **Microorganisms**, v.7, n.11, p. 506, 2019.

OSUOLALE, O.; OKOH, A. Human enteric bacteria and viruses in five wastewater treatment plants in the Eastern Cape, South Africa. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n.5, p. 541-547, 2017.

OTURAN, M. A.; AARON, J. J. Advanced oxidation processes in water/wastewater treatment: principles and applications. A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 23, p. 2577-2641, 2014.

PAES, F. A. et al. Diversity of a Chlorine-Resistant *Bacillus* Population Isolated from a Wastewater Treatment Station. **Water environment research**, v.84, n. 3, p. 274-281, 2012.

PAŹDZIOR, E. *Shewanella putrefaciens*: a new opportunistic pathogen of freshwater fish. **Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 429-434, 2016.

PEKALA-SAFIŃSKA, A. Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 261-267, 2018.

PODSCHUN, R. et al. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **Applied and Environ. Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3325-3327, 2001.

PRUDEN, A. et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. **Environmental science & technology**, v. 40, n.23, 7445-7450, 2006.

RAZAVI, M. et al. Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. **Microbiome**, v. 5, p. 160, 2017.

RIBAS, R. et al. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. **J. of Applied Microbiol.**, v.88, n.4, p.704–710, 2000.

RINCÓN, A. G.; PULGARIN, C. Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO<sub>2</sub> photo-assisted treatment of mixed *E. coli* and *Bacillus* sp. and bacterial community present in wastewater. **Catalysis today**, v.101, n.3, p. 331-344, 2005.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water res.**, v. 45, n. 15, p. 4311-4340, 2011.

RODRÍGUEZ, E. A. et al. Multidrug resistance and diversity of resistance profiles in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli throughout a wastewater treatment plant in Colombia. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 22, p. 358-366, 2020.

SALA, L.; SERRA, M. Towards sustainability in water recycling. **Water Sci. Technol.**, v. 50, n. 2, p. 1–7, 2004.

SALEEM, M., BUKHARI, A.A., AL-MALACK, M.H. Removal efficiencies of indicator microorganisms in the Al-Khobar wastewater treatment plant. **Environ. Eng. Sci.**, v.17, n.4, p. 227–232, 2000.

SALEEM M, BUKHARI A.A., AL-MALACK M.H. Seasonal Variations in the bacterial population in an activated sludge system. **J. Environ. Eng. Sci.** v. 2, p. 155–162, 2003. doi: 10.1139/S03-016

SALGOT, M.; FOLCH, M. Wastewater treatment and water reuse. *Curr. Opin. in Environ. Sci. Health*, v. 2, p. 64-74, 2018.

SCHUETZ, A. N. Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. In: *Seminars in Diagnostic Pathology*. WB Saunders, p. 187-192, 2019.

SENG, P. et al. Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. **Int J Infect Dis.**, v. 45, p. 65-71, 2016. doi: 10.1016/j.ijid.2016.02.014. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26921549.

SEYFARTH, F. et al. The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. **Exp Dermatol**, v.17, p.965-971, 2008.

SHAFIQUE, M.; JAWAID, A.; REHMAN, Y. As (V) reduction, As (III) oxidation, and Cr (VI) reduction by multi-metal-resistant *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis*, and *Bacillus cereus* species isolated from wastewater treatment plant. **Geomicrobiology Journal**, v.34, n.8, p. 687-694, 2017.

SHCHEGOLKOVA, N. M. et al. Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. **Front. Microbiol.**, v. 7, 2016.

SHULER, M.L.; KARGI, F. Immobilized cell systems. In: Bioprocess engineering: basic concepts. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ, pp 263–275, 2002.

SIEGRIST, R.L. Treatment for Pathogen Reduction. In: Decentralized Water Reclamation Engineering. Springer, Cham, 2017, p. 765-823.

SOUZA, B.S. et al. Photochemical radical scavenging and process performance. **Chem. Eng. J.** v. 237, p. 268–276, 2014.

STATE OF CALIFORNIA. Regulations and Guidelines for Recycled Water. Title 22 California Code of Regulations. Department of Health Services: Sacramento, California, USA. 1978.

SUN, H. Y. et al. Outbreak of a novel disease associated with *Citrobacter freundii* infection in freshwater cultured stingray, *Potamotrygon motoro*. **Aquaculture**, v. 492, p. 35-39, 2018.

TACCONELLI, E. et al. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.** World Health Organization, 2017.

TIBURTIUS, E. R. L. et al. Degradação de BTXS via processos oxidativos avançados. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 61-64, 2005.

TURNBULL, P.C.B. (1996). *Bacillus*. In: Barron's Medical Microbiology (Baron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 978-0-9631172-1-2, 1996.

TYPAS, A. et al. From the *B. megaterium* regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.10, 123, 2011.

USMAN, M.; FAROOQ, M.; HANNA, K. Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. *Science of the Total Environment*, v.745, p. 141053, 2020.

VAN ACKER, J. et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 293–297, 2001.

VAN DER KOOIJ, D. Assimilable organic carbon as indicator of bacterial regrowth. **J. Am. Water Works Assoc.**, v.84, p.57-65, 1992.

VITAL M., et al. Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 19, p. 6477–6484, 2010. doi:10.1128/AEM.00794-10

VON GUNTEN, U. Ozonation of Drinking Water: Part In. Disinfection and By-Product Formation In Presence of Bromide, Iodide or Chlorine. **Water Research**, v.37, p.1469–87, 2003. doi:10.1016/S0043-1354(02)00458-X

XU, P. et al. Wastewater disinfection by ozone: Main parameters for process design. **Water Res.**, v. 36, p.1043–1055, 2002.

WANG, Z. H., et al. Composition and structure of microbial communities associated with different domestic sewage outfalls. **Genet. Mol. Res.**, v.13, p. 7542-7552, 2014.

WHO (World Health Organization). 2006. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater. Volume 2: Wastewater use in Agriculture. Geneva:WHO.

WHO. Health Guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. World Health Organization, Technical Report Series 778 WHO, Geneva, CH. 1989.

WHO – World Health Organization website, 2017. Available in: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1)

WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). 2017. The United Nations World Water Development Report 2017: Wastewater, The Untapped Resource. Paris, UNESCO.

WWF. 2020. Water Scarcity. Available in: <https://www.worldwildlife.org/threats/water-scarcity>. Access: sept 2020.

YAN, Y. et al. Comparative evaluation of Bruker Biotyper and BD Phoenix systems for identification of bacterial pathogens associated with urinary tract infections. **J. of Clinical Microb.**, v. 49, n.11, p. 3936-3939, 2011.

YASAR, A. et al. Pathogen regrowth in UASB effluents disinfected by UV, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and advanced oxidation processes. **Ozone Sci. Eng.**, v. 29, p. 485–492, 2007.

YIM, G. et al. Complex integrons containing qnrB4-ampC (bla DHA-1) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from wastewater. **Canadian journal of microbiology**, v. 59, n. 2, p.110-116, 2013

ZHANG, T.; SHAO, M. F.; YE, L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1137-1147, 2012.

ZHANG, Y.; MARRS, C.F.; SIMON, C. C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3702-3706, 2009.

ZEKAR, F.M. et al. From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1569, 2017.

ZHUANG, Y. et al. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.22, p.7037–7044, 2015.

ZIMMERMANN, S. G. et al. Kinetic Assessment and Modeling of an Ozonation Step for FullScale Municipal Wastewater Treatment: Micropollutant Oxidation, By-Product Formation and Disinfection. **Water Research**, v.45, n.2, p. 605–617, 2011. doi:10.1016/j.watres.2010.07.080.

ZURFLUH, K. et al. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. **Intern. J. of Antimicrobial Agents**, v.50, n.3, p. 436-440, 2017.

SES/SIMA(2020)

[http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao\\_urbanismo\\_e\\_meio\\_ambiente/legislacao/leg\\_estadual/leg\\_est\\_resolucoes/Resol-cjta-SES-SIMA-01-2020\\_Processo-ssrh-90-2016\\_reuso-de-agua-nao-potavel\\_fins\\_urbano\\_ETE.pdf](http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao_urbanismo_e_meio_ambiente/legislacao/leg_estadual/leg_est_resolucoes/Resol-cjta-SES-SIMA-01-2020_Processo-ssrh-90-2016_reuso-de-agua-nao-potavel_fins_urbano_ETE.pdf)

### Supplementary Materials

**Table SM1.** Residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during the experiment time

Time (min)	<sup>1</sup> ΔT (seg)	<sup>2</sup> W/m <sup>2</sup>	<sup>3</sup> Q (kJ/L)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)
0	0	61.0	0.0	92.52
2	120	67.2	0.184	85.96
5	180	67.4	0.460	76.33
10	300	67.6	0.923	65.29
15	300	68.1	1.389	61.82
20	300	68.7	1.859	54.75
30	600	69.1	2.804	38.65
40	600	69.8	3.759	30.28

1: ΔT: time interval (T<sub>f</sub>-T<sub>i</sub>); 2: UVC dose; 3: Accumulative UVC energy.

**Table SM2.** Climatological averages of the city of Limeira-SP at the time of samples collection.

Days	Mar/2017		Sep/2017		Feb/2018		Dec/2018		Jul/2019	
	T °C average	Precip (mm)								
1	23.5	22.1	20.5	0	23.2	0	23.7	0	21.1	0
2	22.5	14.5	20.0	0	23.4	0	24.9	0	19.9	0
3	21.8	26.4	20.0	0.1	23.7	0	24.7	20.8	21.2	0
4	23.2	9.4	18.7	0	22.7	0	22.2	0.5	19.8	3.8
5	23.1	11.9	18.9	0	22.6	7.6	21.5	0	15.7	22.4
6	22.5	14.2	19.5	0	22.4	0	22.8	0	10.5	0.3
7	23.8	15.5	19.7	0	23.4	0	20.9	3.6	11.2	0
8	23.3	9.8	20.4	0	24.9	0	18.9	6.9	13.5	0
9	24.7	0	21.1	0	26.3	0	19.4	0.8	15.6	0
10	26.4	0	21.3	0	24.8	0	21	0.3	16.7	0
11	26	0	21.4	0	25	0	23.6	0.3	17.3	0
12	26.2	0	22.5	0	25.4	0	25.3	0.3	18.1	0
13	24.4	1.8	21.8	0	23.9	0	26.3	0	19.8	0
14	23	63	21.9	0	20.5	2.8	24.6	4.8	21.2	0
15	23.2	4.1	22.4	0	20.8	14.7	25.5	13.7	20.4	0
16	24.8	0	22.8	0	22.8	2.5	25.3	0	16.9	1.3
17	25	0	22.0	0	22.6	23.9	23.7	0.3	13.8	0
18	22	10.4	22.5	0	20.5	16.5	23.1	0	15.7	0
19	20.8	0.8	23.0	0	21.3	14.5	19.8	0.3	16.5	0
20	21.7	0	22.1	0	22.7	1.3	20.1	0	17.5	0
21	21.4	0	22.4	0	24.1	2	20.5	2	17.5	0
22	22.4	0	21.4	0	24.7	0	21.5	15	18.5	0
23	22.1	0	22.5	0	24.8	0	21.8	4.1	19.6	0
24	23.5	0	24.8	0	23.8	0	20.4	2.3	20.7	0
25	24.7	0	24.0	0	23.7	0	21.9	46.5	21.4	0
26	23.6	0	21.2	0	21.2	13.7	21.8	0	20.7	0
27	20.6	0	21.4	0	21.4	7.9	22	3.8	20.5	0
28	22.3	0	23.1	7.1	24.3	0	23.7	3.8	19.7	0
29	21.2	0	25.1	0	-	-	25.1	0	19.6	0
30	20.9	0	24.8	9.7	-	-	25.3	0.3	20.1	0
31	20.4	0	-	-	-	-	-	-	19.3	0

T °C: Temperature in Celsius degrees; Precip: rainfall.

## Artigo 2

---

### **Monitoramento do potencial fitotóxico e genotóxico de águas residuárias submetidas a processos oxidativos avançados**

A aplicação de novas tecnologias para o tratamento de águas residuais pode melhorar a qualidade dos efluentes gerados, o que é fundamental para a proteção dos ecossistemas aquáticos, bem como para a reutilização desse efluente. Dentre essas tecnologias, destacam-se os Processos Oxidativos Avançados (POAs), como a ozonização e a radiação ultravioleta (UV) associada ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Porém, embora os POAs sejam indicados para serem aplicados em tratamentos de efluentes, eles podem gerar compostos tóxicos durante a oxidação das substâncias presentes no efluente, que inviabilizam a reutilização das águas e podem comprometer o corpo d'água receptor. Dessa forma, o emprego de bioensaios pode se caracterizar em ferramentas muito útil para avaliar a toxicidade e prever a qualidade dos efluentes finais. Amostras de efluentes secundários de duas ETEs com sistemas de tratamentos distintos, foram submetidas à ozonização ou UV/ $H_2O_2$ , por períodos de 20 (T1) e 40 (T2) minutos e avaliados quanto ao seu potencial fitotóxico e genotóxico. Os resultados com *Lactuca sativa* mostraram inibição do crescimento da raiz, para todas as amostras da ETE Municipal (período seco). Para o ensaio do cometa em células HepG2/C3A, foram observados resultados estatisticamente significativos para as amostras ETE Municipal (período seco) tratadas com UV/ $H_2O_2$  em T1 e T2. Com relação ao ensaio do MN, foi observada indução significativa de MN em todos os tratamentos da ETE Unicamp e para o período seco da ETE Municipal. A presença de brotos nucleares foi estatisticamente significativa para todos os tratamentos realizados com o efluente da ETE Unicamp e para os tratamentos com UV/ $H_2O_2$  da ETE Municipal (coleta inverno). A presença de mais de uma alteração por célula (ex. MN e broto nuclear. MN e ponte) foi estatisticamente significativa para o tratamento com UV/ $H_2O_2$  (T1) da ETE Municipal (período seco). Por fim, quando avaliado o total das alterações (somatória de todos os eventos anteriores), todos os tratamentos da ETE Unicamp; os tratamentos com UV/ $H_2O_2$  (T1 e T2) da ETE Municipal (período seco); e as amostras de efluente, antes do tratamento,  $O_3$ T2 e UV/ $H_2O_2$  T2 para a ETE Municipal (período chuvoso) foram estatisticamente significativos. Nossos resultados mostram que o tratamento com UV/ $H_2O_2$  apresentou um maior potencial genotóxico para as células HepG2/C3A, quando comparados com os tratamentos realizados com  $O_3$ . Além disso, podemos inferir que a qualidade do efluente secundário e a sazonalidade influenciam na eficiência dos tratamentos oxidativos, visto que no

período seco foi observada um maior potencial tóxico das amostras. Portanto, pelos resultados deste estudo, apesar dos POAs serem indicados para o tratamento dos efluentes, é necessária uma avaliação toxicológica da qualidade dos efluentes finais, antes deles serem descartados ou reutilizados para garantir uma maior segurança ambiental.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa*; células de hepatoma humano; ensaio do cometa; ensaio do MN; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ozonização.

## 1. Introdução

Os recursos hídricos estão se tornando cada vez mais vulneráveis, devido às inúmeras atividades antrópicas (atividades urbanas, produção de alimentos, industrialização etc.) e os impactos promovidos pelas mudanças climáticas (GOONETILLEKE; VITHANAGE, 2017; OECD, 2017; UNESCO 2020). Tais atividades têm comprometido a qualidade das águas, caracterizando um sério problema mundial de ordem ambiental e de saúde pública. A falta de água para abastecimento público está entre as principais preocupações do Planeta (WEF, 2019), por isso, a melhora na gestão dos recursos hídricos é essencial para a minimização deste impacto.

Os corpos d'água próximos dos locais de alta densidade demográfica apresentam uma grande quantidade de agentes químicos provenientes, principalmente, do descarte de águas residuais (COORS et al., 2018; MARIA et al., 2007; PEDROZA et al., 2010). As águas residuais são misturas complexas que, devido à sua natureza e origem, podem conter uma infinidade de contaminantes e microrganismos (PEDRAZANNI et al., 2019), agentes esses que podem comprometer severamente a saúde humana. Para evitar que essas águas sejam liberadas *in natura* nos corpos hídricos e deteriore o meio aquático, elas devem passar por processos e tratamentos em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). Os tratamentos convencionais (físicos e biológicos) realizados pelas ETEs removem apenas parcialmente as substâncias orgânicas traços (LIM, 2008; LUO et al., 2014). A associação de tratamentos convencionais de efluentes às tecnologias terciárias é uma interessante estratégia para reduzir ainda mais a carga orgânica, os sólidos em suspensão, os microrganismos e outros poluentes que ainda possam estar presentes, pós tratamento secundário (SALGOT; FOLCH, 2018).

O reúso de efluentes é uma ferramenta de gestão e uso racional de água que, além de mitigar os impactos negativos que os efluentes podem promover ao ambiente, reduz a captação de água dos mananciais, permitindo maior disponibilidade hídrica para os mais diversos fins (SANTOS et al., 2018). Considerando a importância do potencial de reaproveitamento das

águas residuais no mundo moderno, torna-se cada vez mais necessário o uso de tecnologias avançadas de tratamento, bem como a implementação de políticas governamentais e resoluções, que possam incentivar esses processos (CHOUDRI et al., 2020).

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs), empregados no tratamento terciário de efluentes, geram radicais hidroxila capazes de promover a oxidação química de uma vasta gama de contaminantes (DANTAS et al., 2009; PIGNATELLO et al., 2006; RIZZO, 2011; TIBURTIUS et al., 2015), bem como propiciar a desinfecção dos mesmos (ETCHEPARE et al., 2014). Entretanto, os POAs podem levar à formação de compostos tóxicos em decorrência da oxidação e transformação dos compostos orgânicos, uma vez que os radicais gerados são altamente reativos e pouco seletivos (CHUANG et al., 2019; LUO et al., 2014). Por esta razão, deve-se avaliar cautelosamente os subprodutos formados e a toxicidade do efluente submetido aos POAs, para assegurar o nível de efetividade do tratamento (SAI; TAO. 2013).

Neste sentido, os bioensaios constituem ferramentas importantes para monitorar a eficácia dos tratamentos de efluentes (ESCHER et al., 2018; MAGDEBURG et al., 2012; PRASSE et al., 2015), já que as análises químicas de amostras ambientais estimam somente a concentração dos elementos ou das substâncias tóxicas presentes no sistema, não refletindo a real biodisponibilidade dos mesmos (CESAR et al., 2008). Os ensaios que avaliam a toxicidade do efluentes reduzem a necessidade da identificação de um grande número de substâncias e, simultaneamente, conseguem avaliar os subprodutos biologicamente ativos que possam estar presentes, após a aplicação dos POAs (OLESZCZUK, 2008; RIBEIRO et al., 2015). Além disso, esses testes fornecem informações mais detalhadas das características de uma amostra, como efeitos integrados (e.g. sinérgicos, aditivos, antagônicos) e biodisponibilidade dos compostos ali presentes (MELO et al., 2009).

Os bioensaios de germinação e crescimento de raiz em vegetais superiores, bem como os ensaios de cometa e MN são recomendados por agências regulatórias como testes padrões para avaliação de toxicidade de diversos compostos (ISSO, 1995; OECD, 2003; OECD, 2012; OECD, 2016 a; 2016 b; USEPA, 1996;). O teste realizado com a espécie *Lactuca sativa* é uma ferramenta reconhecida para biomonitoramento da fitotoxicidade de efluentes e apresenta vantagens como baixo custo, alta sensibilidade e simples execução (CHARLES et al., 2011; OECD, 2003; USEPA,1996).

O cultivo de células humanas também é muito utilizado em estudos de monitoramento ambiental, por apresentarem uma alta sensibilidade a contaminantes (LIU et al., 2012; MAZZEO et al., 2016; SOMMAGGIO et al., 2018), e eficiência para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de poluentes (LIU et al., 2012; PILLON et al., 2005;

RAGAZZO et al., 2017; WESTERINK et al., 2010). Além disso, de acordo com Mišík et al. (2020), a utilização de linhagens celulares de mamíferos, que possuem sistema de metabolização, ainda é escassa em avaliações da toxicidade de efluentes tratados por POA e, por serem ferramentas comprovadamente eficientes em avaliações da qualidade ambiental (LEME et al., 2012; MANZANO et al 2015), devem também ser utilizadas para este fim.

Assim, apesar de muitos estudos investigarem o destino e a remoção de vários grupos de xenobióticos durante o processo de tratamento de esgoto (HUBER et al., 2005; JOSS et al., 2005; LEE et al., 2008), ainda são necessários mais estudos para compreender como esses tratamentos podem alterar a composição e atividade biológica dos contaminantes ali presentes (MACOVA et al., 2010).

Dessa forma, a importância deste estudo reside no fato de que os POAs, apesar de contribuírem para a eliminação de microrganismos patogênicos e para a degradação de contaminantes presentes nas águas residuais, também oxidam os compostos ali presentes, podendo gerar subprodutos ainda mais tóxicos que os originais (MONARCA et al., 2000). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica de efluentes secundários e terciários (após a aplicação de POAs), coletados sazonalmente em duas ETEs da cidade de Limeira, a fim de se verificar a efetividade dos POAs em remover contaminantes de efluentes que possam ser lançados em corpos d'água ou reutilizados para outros fins. Adicionalmente, foi realizada uma comparação entre o potencial de detoxificação dos efluentes pelos processos de ozonização e pela aplicação combinada de radiação ultravioleta (UV) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Coletas**

Amostras de efluentes foram coletadas em duas ETEs da cidade de Limeira (SP-Brasil), após tratamento secundário convencional: 1. ETE Piloto da Escola de Tecnologia da Universidade de Campinas (ETE Unicamp), que utiliza tecnologia RAFA (reator anaeróbio de fluxo ascendente), para o tratamento de um efluente de composição constante e bastante homogênea. Esta ETE recebe apenas esgoto do Restaurante Universitário, dos banheiros e dos laboratórios da Universidade; 2. ETE Municipal Águas da Serra, em operação desde 2010, responsável pelo tratamento de parte do esgoto da cidade de Limeira (SP-Brasil), que utiliza tratamento primário, seguido de tratamento secundário com lodo ativado, cuja vazão é de 76 L/s. Pelo fato da ETE Municipal estar sujeita a uma maior variação dos seus efluentes, foram

realizadas coletas sazonais, sendo uma em período seco (média de precipitação baixa) e outra em período chuvoso (valor médio mais elevado de precipitação) (Tabela 1).

Todas as amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar (capacidade de 4L), previamente higienizados e identificados. Após a coleta, os efluentes secundários foram imediatamente submetidos aos tratamentos oxidativos avançados.

**Tabela 1:** Precipitação média, em milímetros, e temperaturas médias (°C) mensais dos anos em que as coletas foram realizadas.

Precipitação média (mm)												
Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2017	293,9	76,5	<b>125,4</b>	125,8	123,2	18,0	0	34,7	<b>16,5</b>	183	219,3	164,4
2018	155,2	<b>83,8</b>	140,6	41,7	26,7	9,3	2,5	99,8	83,9	215,9	172,9	140,8
T °C (média)												
Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2017	23,5	24,4	<b>22,9</b>	20,7	18,9	17	16,1	18	<b>21,5</b>	22,5	23,4	21,6
2018	23,2	<b>22,5</b>	24,2	20,9	18,3	18,7	18,4	17	19,8	21,5	22	23,4

Fonte: CIIAGRO. 2020; Fontes em negrito: coletas. Coleta ETE Unicamp: Março de 2017. Coletas da ETE Municipal: Setembro de 2017 e Fevereiro de 2018.

## 2.2 Processos de oxidação avançada (POAs)

Os experimentos foram realizados em bateladas e de modo independentes, utilizando os dispositivos experimentais descritos por Malvestiti e Dantas (2018) e Malvestiti et al. (2018). Foram empregados neste estudo dois tipos distintos de POAs, de modo independente: tratamento com ozônio (O<sub>3</sub>) e tratamento com radiação ultravioleta (UV), combinada com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

O tratamento com O<sub>3</sub> foi realizado em um reator cilíndrico de vidro, com capacidade de 2 litros, ligado a um gerador de ozônio (Ozonar GT 8000. Brazil), que borbulha o gás por difusores de porcelana porosos. A dose de ozônio utilizada foi de 5 e 10 mg/L e a taxa de fluxo de 4 L/min. O tratamento com radiação UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado em um tanque de recirculação, com capacidade de 1 L, sob agitação constante, conferida por um agitador magnético conectado a uma bomba peristáltica (Provitec AWM 5000MB) e a um fotorreator UV-C de 150 mL, operando em recirculação contínua. O fotorreator apresenta uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão (5W), que emite radiação em um comprimento de onda de 254 nm e um fluxo fótonico de cerca de  $9.5 \times 10^{-7}$  Einstein s<sup>-1</sup>. A dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada foi de 90 mg/L.

Para cada processo de oxidação avançada foram aplicados os tempos de reação de 20 (T1) e 40 (T2) minutos. O tempo de 40 minutos foi recomendado por Malvestiti e Dantas (2018) por promover a total eliminação da *Escherichia coli*, organismo indicador de desinfecção. Já, o tempo de 20 minutos foi escolhido como um período intermediário para melhor se avaliar a toxicidade do efluente e, desse modo, verificar se há diferenças no decorrer do tempo de reação. Decorrido cada período, foram realizadas coletas das amostras tratadas de cada efluente, que foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar (capacidade de 4L), previamente higienizados e identificados, os quais foram armazenados a 4 °C, no escuro, até a realização dos bioensaios. A caracterização físico-química média dos efluentes, antes e após tratamentos oxidativos, está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2:** Caracterização das amostras de efluentes obtidos na ETE Unicamp e na ETE Municipal, ambas da cidade de Limeira (SP-Brasil), antes e após aplicação dos processos oxidativos avançados.

Parâmetros	ETE Unicamp			ETE Municipal		
	Antes	Após O <sub>3</sub>	Após UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Antes	Após O <sub>3</sub>	Após UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>pH</b>	6,9 ± 0,4	7,14 ± 1,0	6,9 ± 0,7	7,1 ± 0,4	7,2 ± 0,5	6,74 ± 0,4
<b>SST (mg L<sup>-1</sup>)</b>	74,8 ± 5,3	13,4 ± 1,0	20,5 ± 1,5	36,7 ± 1,8	18,2 ± 1,3	22,5 ± 0,9
<b>Alcalinidade (mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	487,6 ± 34,2	89,8 ± 15,4	108,1 ± 28,0	324,4 ± 20,4	204,3 ± 23,7	208,3 ± 16,5
<b>UV<sub>254</sub> (cm<sup>-1</sup>)</b>	1,3 ± 0,1	0,21 ± 0,02	0,72 ± 0,05	0,06 ± 0,05	0,05 ± 0,2	0,05 ± 0,1
<b>Turbidez (NTU)</b>	78,1 ± 7,3	14,2 ± 3,1	19,4 ± 4,3	63,1 ± 5,7	52,2 ± 6,2	50,1 ± 6,9
<b>DQO (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	202 ± 8,6	71,2 ± 8,3	105,2 ± 26,3	96,2 ± 8,6	48,4 ± 10,2	52,4 ± 8,3
<b>DBO<sub>5</sub> (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	63,8 ± 7,4	20,1 ± 3,8	32,1 ± 4,6	18,8 ± 0,7	5,82 ± 0,8	5,53 ± 0,8

SST: Sólidos Suspensos Totais; DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio.

### 2.3 Bioensaio com *Lactuca sativa*

Os ensaios foram realizados com sementes de *L. sativa* da variedade “Grand rapids”, não tratadas quimicamente (sem tratamento com fungicida). Foi seguindo o protocolo estabelecido por Sobrero e Ronco (2004), onde 20 sementes foram dispostas em placas de Petri (90 mm de diâmetro), forradas com papel filtro embebido com 4 mL das amostras (antes e após aplicação do POA em T1 e T2) ou dos controles. O controle positivo (CP) foi realizado com solução de sulfato de zinco (0,05M) e o controle negativo (CN) com água de osmose reversa. Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas foram mantidas, durante toda a exposição, em BOD, no escuro, por 120 horas a 22 °C.

Foram analisados os seguintes parâmetros:

- (1) germinação de sementes (GS), correspondendo a porcentagem de germinação de cada amostra;
- (2) Índice de crescimento da raiz (ICR), calculado pela equação  $ICR = RA / RC$ , onde RA é o valor médio da radícula da amostra e RC é o valor médio da radícula do controle negativo.

Neste parâmetro, os valores do ICR foram sub-divididos em três categorias, de acordo com os efeitos de toxicidade:

- (a) inibição do alongamento da radícula:  $0 < ICR < 0,8$ ;
  - (b) nenhum efeito significativo:  $0,8 \leq ICR \leq 1,2$ ;
  - (c) estimulação do alongamento da radícula:  $ICR > 1,2$  (YOUNG et al., 2012);
- (3) mensuração do crescimento da radícula (CR) e do hipocótilo (CH), utilizando um paquímetro digital.

### 2.4 Ensaio com cultura de células HepG2/C3A

#### 2.4.1 Preparação das amostras para o ensaio com cultura de células

Primeiramente, o pH das amostras foi corrigido para 7,3 e, em seguida, as amostras foram esterilizadas, por filtração, com membranas de poliéster sulfona de 0,22 µm de porosidade (HARA; MARIN-MORALES, 2017).

Para a realização dos bioensaios com cultura de células, foi utilizado um volume de 20 % de amostra no meio de cultura. A escolha desse volume foi baseada no estudo de Reifferscheid et al. (2008), onde os autores citam que alterações na osmolalidade, causada pela adição de água nessa proporção no meio de cultivo celular, não induz efeitos citotóxicos ou genotóxicos nas células.

### 2.4.2 Linhagem celular

A linhagem celular HepG2/C3A, derivada de células de hepatoma humano, foram obtidas no Banco de células do Rio de Janeiro (Brasil). As culturas, mantidas em frascos descartáveis de 25 cm<sup>2</sup>, foram cultivadas em 5 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (10.000 U.I./mL penicilina e 10 mg/mL estreptomicina), em incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) a 37 °C. Nessas condições, o ciclo celular dessa linhagem é de aproximadamente 24 horas.

### 2.4.3 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com Tice et al. (2000) com algumas modificações. Aproximadamente, 5 x 10<sup>5</sup> células foram cultivadas em frascos individuais, por 24 horas, para promover a estabilização da cultura celular. Em seguida, foram adicionados os tratamentos (20% das amostras dos efluentes, antes e após os POA, T1 e T2) por 3 horas, sendo o ensaio realizado em triplicata. Posteriormente, foi realizada a colheita das células.

Antes da montagem das lâminas com a suspensão celular, foi realizado o teste de viabilidade celular com o Azul de Trypan, quantificando, em câmara de Neubauer, a presença de células brancas (células viáveis) e as azuis (não viáveis). Quando a viabilidade celular foi igual ou maior que 80%, deu-se continuidade ao experimento.

As lâminas, previamente cobertas com agarose comum, foram montadas com 20 µL da suspensão celular mais 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37 °C. Posteriormente, foram submetidas à solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10 e mantidas no escuro a 4 °C, por 1 hora. Na sequência, foi realizada a corrida eletroforética por 20 minutos, em tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13) a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Logo após, as lâminas foram neutralizadas com banhos em tampão de neutralização (pH 7,2) e, então, fixadas em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas, imediatamente, após coloração. Foram contabilizados, em microscopia de fluorescência (Leica - modelo DM 4000B), objetiva de 40x, filtro B - 34 (excitação: λ=420 n - 490 nM,

barreira: I=520 nM)), 50 nucleoides por lâmina e 2 lâminas por frasco (LOVELL; OMORI, 2008; REISINGER et al., 2018), totalizando uma avaliação de 300 nucleoides por tratamento.

Os danos nos nucleoides foram avaliados pelo software *Comet Assay IV*, considerando os parâmetros de momento da cauda de Olive e a intensidade da cauda (KUMARAVEL et al., 2009; OECD, 2016a). O primeiro representa o produto da proporção entre a intensidade da cauda e a distância do centro da massa da cauda, em relação ao centro de massa da cabeça do cometa (OLIVE et al., 1990). Já a intensidade da cauda, cuja análise é recomendada pelo guia da OECD 489 (2016a), representa a porcentagem de DNA na cauda.

As análises estatísticas foram realizadas considerando os valores médios da intensidade da cauda e momento de cauda de Olive, de cada lâmina. Os outliers foram removidos para evitar superestimativas (BRIAZENI; CAMARGO; MIOT, 2009; YANUARYSKA, 2018). Esta remoção foi feita pelo software GraphPad Prism 8.0.1., método ROUT, conforme recomendado por Motulsky e Brown (2006).

#### **2.4.4 Teste do MN com bloqueio de citocinese**

O ensaio do MN foi realizado de acordo com Natarajan and Darroudi (1991), com algumas modificações. Cerca de  $1 \times 10^6$  células foram cultivadas em frascos de cultura ( $25 \text{ cm}^2$ ) individuais, por 24h (ciclo celular completo). As células foram expostas a 20% das amostras dos efluentes (antes e após os POA, para T1 e T2), por 3 horas. Para controle negativo (CN), foi utilizado 20% de PBS, e para controle positivo (CP) foi usado uma solução de 10 mM metilmetano sulfonato. O ensaio foi realizado em triplicata. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 5 mL de meio de cultura completo contendo  $3,5 \mu\text{g/mL}$  de citocalasina B. Os frascos foram incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30h (RAGAZZO et al., 2017). Posteriormente, as células foram coletadas e fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético, 3:1 v/v). O preparo e a montagem das lâminas foram realizados conforme descrito por Sommaggio et al. (2018).

Foram analisadas, sob microscopia de luz (1000 x), aproximadamente 6000 células por tratamento e para os controles. A presença de MN, brotos (B), pontes (P) e alterações compostas (célula contendo mais de uma anormalidade, ex. MN+B) nas células binucleadas foi considerada como potencial genotóxico das amostras estudadas. Além disso, foi realizada, de acordo com o guia 487 da OECD (2016b), a quantificação do

índice de proliferação celular com bloqueio de citocinese (IPBC), determinado pela fórmula:  $IPBC = [(N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3)] / n^\circ$  total de células, onde N1 é o número de células mononucleadas, N2 é o número de células binucleadas e N3 é o número de células multinucleadas.

## 2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada inicialmente com teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como teste paramétrico, foi usada a análise de variância ANOVA – um critério, seguido do post hoc Dunnet. Já o teste de Kruskal-Wallis foi empregado como teste não paramétrico, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi  $p < 0,05$ .

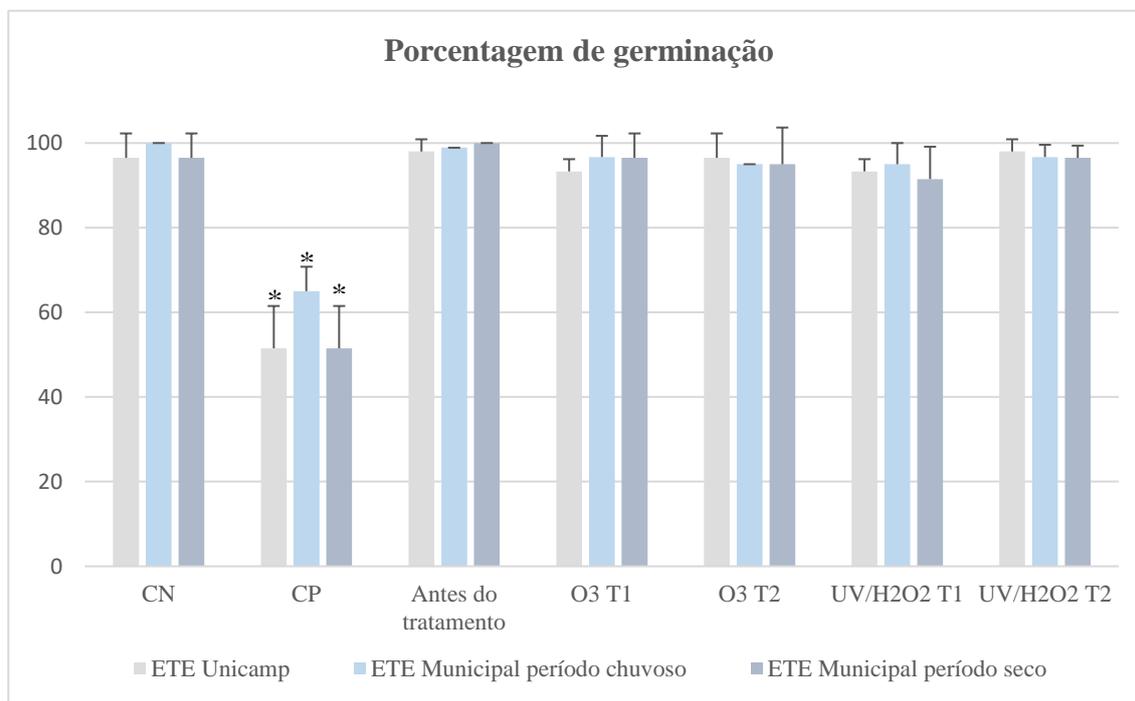
## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 *Lactuca sativa*

As plantas são membros essenciais dos ecossistemas e são sensíveis aos estresses ambientais, por isso são consideradas apropriadas para avaliação de riscos ambientais (MA; GRANT; SERRES. 1997; GOPALAN, 1999). Testes de fitotoxicidade em plantas, como por exemplo em *Lactuca sativa*, são considerados indicados para avaliação da toxicidade de efluentes tratados (RIZZO, 2011; TAVARES et al., 2016). Esta metodologia, além de ser capaz de prever possíveis consequências do reuso desses efluentes para fins agrícolas, também auxilia na certificação da qualidade dos efluentes sob ponto de vista ambiental.

A germinação observada para todos os tratamentos, com exceção do CP, foi superior a 90 % (Figura 1), demonstrando que nenhum dos tratamentos estudados foi tóxico para a espécie *L. sativa*. Dash (2012) estudou os efeitos do esgoto doméstico sobre a germinação de sementes de arroz e Iakovides et al. (2019) utilizaram as espécies *Lepidium sativum* e *Sinapis alba* para avaliação de amostras de águas residuais brutas. Em ambos os estudos, os autores não observaram diferenças significativas na germinação desses vegetais.

**Figura 1:** Porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa*, expostas a amostras de efluentes obtidas antes e após os tratamentos oxidativos avançados.



CN: controle negativo; CP: controle positivo; O3: tratamento de ozonização; UV/H2O2: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos.

Os índices de crescimento relativo da raiz (ICR) indicaram que as amostras coletadas antes do tratamento oxidativo da ETE Municipal, para o período chuvoso, e todas as amostras desta ETE, coletadas no período seco, inibiram o crescimento radicular (Tabela 3). Os valores médios do crescimento das radículas estão apresentados na Figura 2 e complementam os dados de ICR. No período chuvoso (ETE Municipal), não foi observada redução significativa do crescimento radicular para amostra, antes do tratamento, como mostrado no ICR, no entanto, o valor de crescimento da radícula foi significativamente maior para o tratamento UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-T2. Dessa forma, os tratamentos oxidativos avançados, realizados no período chuvoso, parecem ser mais efetivos para melhorar a qualidade do efluente secundário, com relação ao parâmetro crescimento da raiz. Em contrapartida, para o período seco, o comprimento médio das radículas foi significativamente menor para todos os tratamentos (antes e após aplicação dos POA), quando comparado ao CN. Pelos resultados observados, podemos inferir que os efluentes do período seco continham substâncias tóxicas, capazes de inibir o crescimento das radículas de *L. sativa*.

As variações sazonais podem levar a uma alteração na concentração dos contaminantes presentes nas águas residuais. Durante a estação chuvosa, pode haver uma diluição dos poluentes presentes nas águas, o que não é observado em períodos secos (COELHO et al., 2020). Dessa forma, a variação sazonal pode alterar a composição química e física do efluente e, conseqüentemente, a eficiência dos tratamentos. Vieno, Tuhkanen e Kronberg (2005) estudaram a variação sazonal de alguns poluentes em efluentes de uma ETE e observaram que a concentração das substâncias estudadas foi de 3 a 5 vezes maior no inverno que em outras estações, o que levou a uma menor eliminação desses poluentes durante o tratamento na ETE. Desta forma, os resultados observados no presente estudo, para as estações seca e chuvosa, podem estar relacionados com uma maior concentração de poluentes no período seco, corroborando as citações dos autores acima, visto que, na estação chuvosa, foi observada fitotoxicidade apenas para a amostra coletada antes do tratamento, enquanto na estação seca, a fitotoxicidade da radícula foi detectada para todas as amostras.

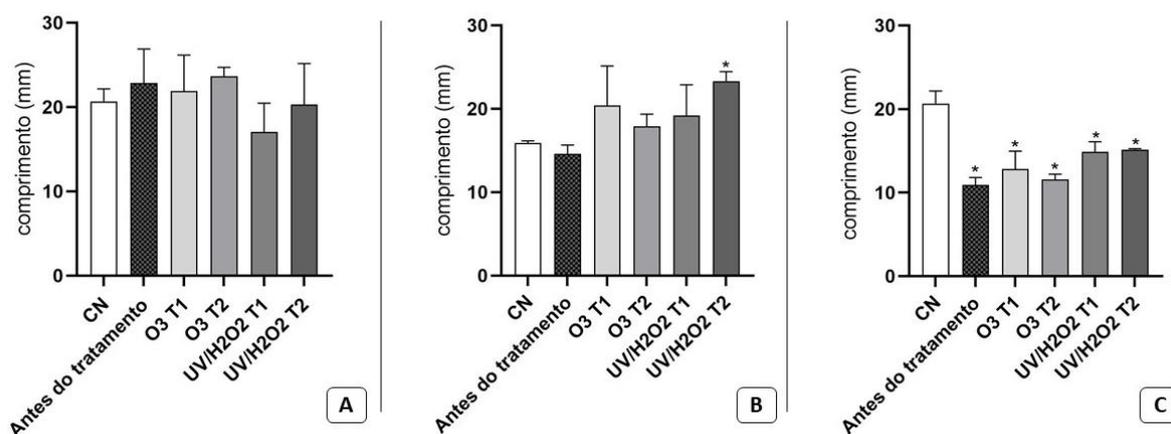
Além disso, como foram observados resultados significativos antes e após os tratamentos para as amostras do período seco, o efeito observado para as amostras submetidas aos POAs parece ser decorrente de substâncias fitotóxicas persistentes, presentes no efluente secundário, as quais, devido à sua alta concentração, não foram eficientemente removidas pelos tratamentos aqui empregados. Embora tenha havido uma melhora nos resultados dos ensaios de ICR, realizados com as amostras após a aplicação dos POAs, em relação ao efluente não tratado, esta melhora não foi suficiente para reestabelecer o padrão normal de crescimento da raiz de *L. sativa*. Beretsou et al. (2020) também relataram uma inibição significativa do crescimento das raízes de espécies vegetais submetidas à germinação em efluentes antes e após aplicação de POAs, evidenciando um efeito fitotóxico persistente ao tratamento, o qual só foi diminuído com um aumento na fluência da UV. Assim, possivelmente, seria necessário um aumento no tempo dos tratamentos dos POAs, superior a 40 minutos, para promover uma melhor eliminação dos contaminantes com ação fitotóxica presentes nas amostras aqui estudadas. Já, para as amostras da ETE Unicamp, não foram observadas alterações significativas no comprimento radicular.

**Tabela 3:** Índice de crescimento relativo da radícula de *Lactuca sativa* expostas às amostras de efluentes, antes e após tratamentos oxidativos avançados de ozonização (O<sub>3</sub>) ou radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Índice de crescimento relativo (ICR)			
Amostras	ETE Unicamp	ETE Municipal	
		Período chuvoso	Período seco
Antes do tratamento	1,1	0,6 *	0,5 *
O <sub>3</sub> T1	1,1	0,9	0,6 *
O <sub>3</sub> T2	1,1	0,8	0,6 *
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1	0,8	0,8	0,7 *
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2	1,0	1,0	0,7 *

\* inibição do alongamento da radícula:  $0 < \text{ICR} > 0,8$ . O<sub>3</sub>: tratamento de ozonização; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos.

**Figura 2:** Média do crescimento das radículas de *Lactuca sativa* expostas às amostras de efluentes antes e após, tratamentos oxidativos avançados de ozonização (O<sub>3</sub>) ou radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

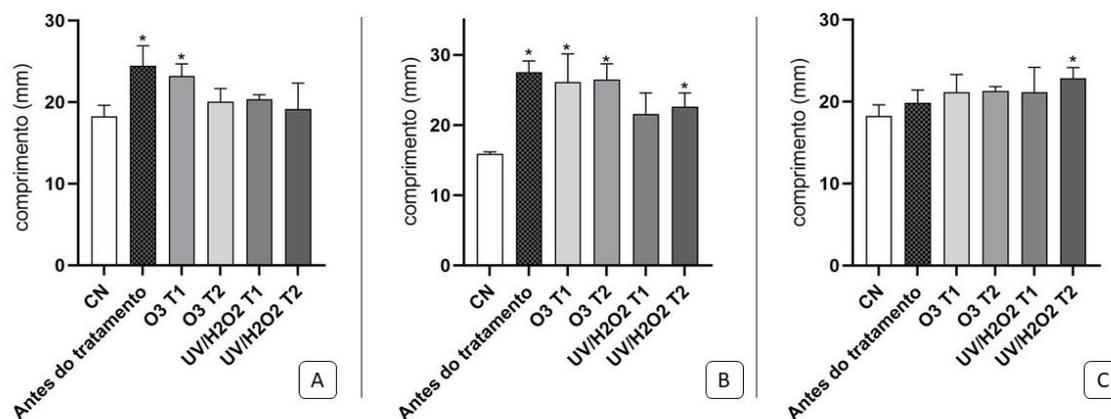


\* estatisticamente significativo (ANOVA- um critério). A: ETE Unicamp; B: ETE Municipal período chuvoso; C: ETE Municipal período seco; O<sub>3</sub>: tratamento de ozonização; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos.

Quanto à avaliação do comprimento do hipocótilo de *L. sativa* (Figura 3), nenhuma das amostras testadas causou uma inibição no crescimento desta estrutura. Contudo, foi observado um efeito indutor no crescimento do hipocótilo para sementes expostas às amostras do efluente antes do tratamento e após tratamento com O<sub>3</sub> T1 da ETE Unicamp; para o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (período seco) da ETE Municipal; e para todas as amostras do período chuvoso da ETE Municipal (com exceção da UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1). Isso pode ter ocorrido devido à possível presença de alguns compostos com potencial de estimulação de desenvolvimento, como por exemplo nutrientes, nas amostras desses efluentes, já que se trata de uma mistura complexa. De acordo com Solaiman et al. (2012), a presença de nutrientes no substrato de crescimento dos vegetais tem um efeito estimulante sobre a alongação das raízes.

A utilização do alongamento da radícula como parâmetro de avaliação de fitotoxicidade de misturas complexas demonstrou ser mais sensível no presente estudo que o parâmetro de germinação das sementes. Isso também foi observado por Neves et al. (2020), que estudaram a fitotoxicidade de águas residuais de uma indústria de papel, após tratamento por POA. Esses autores descreveram que a inibição do alongamento da raiz foi uma resposta biológica mais sensível que a inibição da germinação da semente. Dessa forma, é importante a avaliação de diferentes biomarcadores em um mesmo organismo, pois podemos obter diferentes respostas. Além disso, também é importante o acompanhamento sazonal da toxicidade de efluentes, visto que, no presente estudo, as amostras do período seco demonstraram ser mais tóxicas que as do período chuvoso.

**Figura 3:** Média do crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa*, expostas às amostras de efluentes antes e após tratamentos oxidativos avançados de ozonização (O<sub>3</sub>) ou radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



\* estatisticamente significativo (ANOVA- um critério). A: ETE Unicamp; B: ETE Municipal período chuvoso; C: ETE Municipal período seco; O<sub>3</sub>: tratamento de ozonização; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos.

### 3.2 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa, realizado neste estudo com células HepG2/C3A, foi utilizado para avaliar o potencial genotóxico das amostras dos efluentes estudados. Esse método é sensível e de baixo custo, sendo considerado eficiente para medir, em células individuais, os efeitos genotóxicos de misturas complexas (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; LEE; STEINERT, 2003). Além disso, a linhagem celular HepG2 possui capacidade metabólica endógena, e, por serem células hepáticas, são um dos primeiros tipos celulares que entram em contato com os compostos químicos absorvidos após absorção intestinal (WESTERINK et al., 2011).

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras dos efluentes estudados e os controles. Todas as amostras dos efluentes apresentaram viabilidade celular acima de 80% (Tabela 4), demonstrando que nenhum dos tratamentos foi citotóxico para as células HepG2/C3A.

**Tabela 4:** Viabilidade celular do ensaio do cometa, realizado em células HepG2/C3A mantidas em cultura.

Amostras	Viabilidade celular (%)		
	ETE Unicamp	ETE Municipal	
		Período chuvoso	Período seco
<b>Controle Negativo</b>	91,6	92,3	92,3
<b>Controle Positivo</b>	98,0	91,0	89,3
<b>Antes do tratamento</b>	95,6	94,0	94,3
<b>O<sub>3</sub> T1</b>	95,0	95,3	95,3
<b>O<sub>3</sub> T2</b>	85,7	93,3	93,3
<b>UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1</b>	98,3	92,6	92,6
<b>UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T2</b>	96,3	95,3	90,5

O<sub>3</sub>: tratamento de ozonização; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos.

Foram utilizados dois parâmetros para análise do ensaio do cometa, momento da cauda de Olive e porcentagem de DNA na cauda, como sugerido por diversos autores (HARTMANN et al., 2003; TICE et al., 2000; WANG et al., 2016), para uma melhor acurácia dos resultados. As amostras da ETE Unicamp e ETE Municipal-período chuvoso não apresentaram resultados estatisticamente significativo, para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabelas 5 e 6). Enquanto, os resultados das amostras da ETE Municipal-período seco submetidas ao tratamento de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1 e T2, induziram efeitos genotóxicos significativos em células HepG2/C3A, em relação ao CN e ao efluente antes do tratamento.

**Tabela 5:** Momento da cauda de Olive, quantificados no ensaio do cometa realizado com células HepG2/C3A mantidas em cultura.

<b>Momento da Cauda de Olive</b>			
<b>Tratamento</b>	<b>ETE Unicamp</b>	<b>ETE Municipal</b>	
		<b>Período chuvoso</b>	<b>Período seco</b>
<b>Controle Negativo</b>	0,69 ± 0,23	0,76 ± 0,24	0,52 ± 0,20
<b>Controle Positivo</b>	1,56 ± 0,36 *	3,19 ± 2,58 *	5,29 ± 0,92*
<b>Antes do tratamento</b>	0,75 ± 0,19	0,56 ± 0,19	0,69 ± 0,17
<b>O<sub>3</sub> T1</b>	0,90 ± 0,27	0,53 ± 0,14	0,76 ± 0,24
<b>O<sub>3</sub> T2</b>	0,79 ± 0,24	0,68 ± 0,26	0,54 ± 0,13
<b>UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1</b>	0,68 ± 0,24	0,65 ± 0,07	6,81 ± 1,54 * +
<b>UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T2</b>	0,63 ± 0,06	0,68 ± 0,09	4,16 ± 0,71 * +

\*estatisticamente significativo quando comparado ao CN; +estatisticamente significativo quando comparado ao efluente antes do tratamento por POA.  $p < 0,05$ . O<sub>3</sub>: tratamento de ozonização; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos.

**Tabela 6:** Porcentagem de DNA na cauda (*tail intensity*), quantificados no ensaio do cometa realizado com células HepG2/C3A mantidas em cultura.

<b><i>Tail intensity</i> -Porcentagem de DNA na cauda</b>			
<b>Tratamento</b>	<b>ETE Unicamp</b>	<b>ETE Municipal</b>	
		<b>Período chuvoso</b>	<b>Período seco</b>
<b>Controle Negativo</b>	6,83 ± 1,24	6,77 ± 2,18	5,13 ± 2,45
<b>Controle Positivo</b>	10,54 ± 0,84 *	18,58 ± 5,00 *	21,89 ± 3,80 *
<b>Antes do tratamento</b>	7,92 ± 2,23	5,85 ± 1,29	6,31 ± 2,27
<b>O<sub>3</sub> T1</b>	9,55 ± 2,96	6,34 ± 1,50	6,73 ± 1,61
<b>O<sub>3</sub> T2</b>	8,08 ± 1,94	7,81 ± 3,43	4,94 ± 1,19
<b>UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1</b>	7,69 ± 2,87	8,01 ± 1,36	25,66 ± 4,53 * +
<b>UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T2</b>	6,94 ± 1,08	7,50 ± 2,36	19,03 ± 3,30 * +

\* estatisticamente significativo quando comparado ao CN; +estatisticamente significativo quando comparado ao efluente antes do tratamento por POA.  $p < 0,05$ . O<sub>3</sub>: tratamento de ozonização; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos.

Esses resultados demonstraram que, após o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve uma indução significativa da genotoxicidade, sugerindo que esse tratamento pode ter gerado subprodutos com atividades genotóxicas para as células HepG2/C3A, já que a amostra antes do tratamento não apresentou tal efeito. Nossos dados corroboram os resultados obtidos por Heringa et al. (2011), que observaram um aumento da atividade genotóxica em amostras de água superficial submetidas a tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que os autores inferiram ser decorrentes da formação de subprodutos durante o processo de tratamento. Reungoat et al. (2010) utilizaram POA para remoção de poluentes da água e observaram uma diminuição da toxicidade das amostras, somente quando foi empregado um pós-tratamento posterior à etapa de oxidação.

A oxidação parcial de contaminantes orgânicos pode resultar na formação de intermediários mais tóxicos que os compostos originais (RIZZO, 2011). Alguns componentes das águas residuais podem influenciar na formação de radicais e/ou no espalhamento da luz UV, alterando a eficiência dos POAs e, conseqüentemente, afetando a desinfecção e eliminação completa de poluentes (MALVESTITI; DANTAS, 2018 e 2019).

Como a composição das águas residuais é muito complexa, pela ampla variedade de contaminantes que possui (BARCELÓ; PETROVIC et al., 2008; GIGER, 2009), nem sempre a aplicação de POAs é eficiente e adequada, pois pode existir uma grande diversidade de grupos químicos na mistura ou uma alta concentração de algumas substâncias nos efluentes.

Outro ponto importante a ser considerado e já relatado em alguns estudos é que, muitas vezes, a comprovação da eficiência de processos de tratamento é feita apenas por análises químicas de algumas substâncias isoladas, que podem estar em concentrações abaixo dos limites de segurança exigidos para efluentes pós-tratados. Contudo, a exposição combinada dessas substâncias, mesmo em baixas concentrações, com outros compostos não identificados do efluente podem levar a efeitos adversos à saúde humana e/ou ao ecossistema (JRC, 2018; KORTENKAMP, FAUST. 2018). Desse modo, os efeitos genotóxicos de amostras complexas podem estar associados à ações aditivas, sinérgicas, antagonicas ou potencializadoras dos compostos ali presentes (ZEGURA et al., 2009). Dessa forma, os resultados significativos obtidos para o ensaio do cometa, realizados com amostras coletadas no período seco (ETE Municipal), podem ter sido decorrentes de interações entre os subprodutos gerados durante o processo de oxidação avançada, e não apenas de uma única substância.

Outro fator determinante da toxicidade dos efluentes de ETEs são as condições meteorológicas, que podem alterar, significativamente, a concentração dos poluentes nas águas residuais. Os eventos de chuva intensa podem levar à uma diluição significativa dos poluentes das águas residuais (ROULEAU et al., 1997). Kasprzyk-Hordern et al. (2009) descobriram que as concentrações de alguns poluentes (ex. produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais) podem ser duplicadas nos efluentes durante as condições de seca, sugerindo que a água da chuva pode diluir as concentrações dos compostos presentes no esgoto. Outras condições meteorológicas, como a temperatura e o nível de luz solar, também podem afetar a quantidade de contaminantes das ETEs (LUO et al., 2014), devido aos processos naturais de degradação dessas moléculas nas ETEs. Essas citações corroboram com os resultados obtidos para o efluente da ETE Municipal período seco. Neste caso, os contaminantes genotóxicos poderiam estar presentes em uma maior quantidade no efluente da ETE Municipal (período seco), o que pode ter atrapalhado a eficiência dos POA na mineralização completa desses poluentes, levando, após o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à formação de subprodutos com potenciais genotóxicos para as células HepG2/C3A.

Já, para os tratamentos com o ozônio não foram observados resultados estatisticamente significativos, para nenhum dos períodos avaliados no ensaio do cometa. Isso pode ser devido a completa mineralização de alguns contaminantes genotóxicos ali presentes, pelo tratamento com O<sub>3</sub>, ou então, as substâncias presentes nas amostras não foram degradadas em subprodutos com características genotóxicas, capazes de causarem lesões na fita de DNA das células estudadas. Nossos resultados corroboram os apresentados por Mišík et al. (2020) que, ao estudarem a atividade genotóxica de águas residuais tratadas, por meio do ensaio do cometa em células HepG2, não observaram resultados significativos de genotoxicidade para as amostras tratadas com ozônio. Esses resultados mostram uma maior eficiência do tratamento de efluentes por ozonização do que o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que a ozonização não resultou na formação de subprodutos com capacidade de indução de danos ao DNA resultantes de quebras (fita simples ou duplas), danos álcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão de bases, os quais são eficientemente detectados pelo ensaio do cometa alcalino (HARTMANN et al., 2003; SILVA et al., 2000; SINGH et al., 1988; TICE, 1995).

### 3.3 Ensaio do MN com bloqueio de citocinese

Reifferscheid et al. (2008) avaliaram, em um estudo interlaboratorial, a sensibilidade do ensaio do MN *in vitro*, na detecção de genotoxicidade de amostras de águas residuais. Os autores concluíram que o ensaio do MN em células de mamíferos é adequado como método de rotina para avaliação da genotoxicidade dessa matriz, podendo ser um teste complementar a outros ensaios já padronizados e reconhecidos por agências regulatórias.

No presente estudo foi utilizada a linhagem celular de hepatoma humano (HepG2/C3A), que, por possuir enzimas da fase I e fase II, é muito empregada em estudos de genotoxicidade (KNASMÜLLER et al., 2004; MISIK et al., 2019). Essa característica foi essencial para a escolha desse modelo experimental no presente estudo, já que o metabolismo pode também alterar os resultados de toxicidade nos organismos. Experimentos de mutagenicidade com células de hepatoma mostraram melhores resultados do que com células de bactérias ou mamíferos, comumente utilizadas em testes de rotina de produtos químicos (ex. CHO), sendo encontrado uma alta sensibilidade e especificidade dos resultados para esse tipo celular (FOWLER et al., 2012; WESTERINK et al., 2011)

As análises do IPBC (Tabela 7), que indicam o número médio de ciclos celulares sofrido por uma determinada célula, usadas na avaliação da citotoxicidade, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e o CN, bem como entre as amostras, antes e após aplicação dos POA.

Para o parâmetro de genotoxicidade, também foi avaliada a presença de MNs em células binucleadas (Tabela 7 e Figura 4), a qual, segundo Fenech (2007), são biomarcadoras de quebras e/ou perdas cromossômicas, que revelam a indução direta de danos cromossômicos e a instabilidade genômica (LAJMANOVICH et al., 2014). Os resultados mostraram aumento significativo no número de MN, para todos os tratamentos (antes e após POA) realizados com as amostras ETE Municipal –período seco e da ETE Unicamp, em relação aos resultados do CN. Esses resultados demonstraram que todas essas amostras continham substâncias capazes de induzir alterações no material genético das células HepG2/C3A.

Com relação a ETE Unicamp, pode-se inferir ainda que as substâncias presentes nas amostras, provavelmente, tenham potenciais aneugênicos, já que não houve resultados significativos dessas amostras no ensaio do cometa. Diferentemente do ensaio do cometa, o teste do MN permite, além da verificação da ação de compostos químicos

com potencial clastogênico, também daqueles com ação aneugênica. Os danos ao material genético podem levar à perda de partes dos cromossomos ou até cromossomos inteiros do núcleo, os quais podem ser observados no citoplasma, após a divisão celular mitótica, como micronúcleo nas células filhas recém-formadas (REIFFERSCHIED et al., 2008).

As amostras da ETE Municipal-período seco, provavelmente, apresentavam compostos com potenciais aneugênicos e clastogênicos, pois também foram observados resultados significativos em algumas amostras no ensaio do cometa. Geralmente, os tratamentos empregados pelas ETEs não são capazes de eliminar completamente os poluentes das águas residuais. Assim, muitas substâncias presentes nos esgotos persistem, mesmo após o processo de tratamento, devido à sua característica química recalcitrante ou pela grande quantidade e frequência contínua com que são introduzidas no esgoto (LUO et al., 2014). Pereda et al. (2020) estudaram o impacto da poluição de efluentes gerados em uma ETE urbana de tratamento terciário sobre as águas de um riacho. Os autores observaram que, mesmo os efluentes sendo adequadamente tratados e diluídos, quando descartados no corpo d'água, afetaram, de maneira negativa, o funcionamento do ecossistema do riacho estudado. Tal fato ressalta a importância da avaliação toxicológica realizada com efluentes de ETEs (antes e após tratamentos), como no presente estudo, bem como a importância de realização de monitoramento constante de atividades biológicas de efluentes tratados.

Quando as amostras submetidas aos POAs foram comparadas com as amostras dos efluentes coletados antes desses processos, não foram observados resultados estatisticamente significativos para o parâmetro de MN. Portanto, com relação a formação dos MNs, os resultados significativos observados foram decorrentes da presença de compostos genotóxicos no efluente das ETEs, antes dos tratamentos oxidativos avançados, que persistiram nesses efluentes, mesmo após os POAs. Muitos estudos demonstraram que não há uma remoção completa de poluentes, após tratamentos convencionais realizados nas ETEs, e que esses contaminantes podem ter uma toxicidade considerável para os organismos (JOSS et al., 2005; LUO et al., 2014; PRASSE et al., 2015; STASINAKIS et al., 2013; VÄLITALO et al., 2016).

**Tabela 7:** Alterações genotóxicas encontradas em células HepG2/C3A expostas a amostras de efluente das ETEs antes e após aplicação de processos oxidativos avançados.

		<b>MN</b>	<b>Broto</b>	<b>Ponte</b>	<b>A.C.</b>	<b>Total</b>	<b>IPBC</b>	
<b>ETE Unicamp</b>	CN	10,2 ± 2,6	9,2 ± 1,7	3,3 ± 1,2	0,8 ± 1,0	23,5 ± 2,0	1,86	
	CP	<b>34,5 ± 5,1 *</b>	<b>23,5 ± 5,0 *</b>	6,5 ± 2,3	<b>8,2 ± 2,6*</b>	<b>72,7 ± 6,7*</b>	1,98	
	Antes do tratamento	<b>21,8 ± 2,2 *</b>	<b>19,2 ± 6,3 *</b>	2,8 ± 1,9	3,0 ± 2,2	<b>45,2 ± 8,3 *</b>	1,88	
	O <sub>3</sub> T1	<b>22,7 ± 3,9 *</b>	<b>18,3 ± 4,0 *</b>	4,5 ± 2,4	2,00 ± 1,41	<b>47,5 ± 6,9 *</b>	1,88	
	O <sub>3</sub> T2	<b>23,8 ± 3,1 *</b>	<b>18,7 ± 3,7 *</b>	3,3 ± 1,7	2,5 ± 0,8	<b>48,2 ± 5,8 *</b>	1,93	
	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1	<b>27,7 ± 3,6 *</b>	<b>30,2 ± 7,1* +</b>	6,2 ± 2,9	3,5 ± 1,8	<b>67,5 ± 10,6**</b>	1,49	
	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2	<b>21,5 ± 2,6 *</b>	<b>23,3 ± 4,0 *</b>	3,8 ± 1,3	2,8 ± 1,2	<b>51,5 ± 7,3 *</b>	1,53	
<b>ETE Municipal</b>	<b>Período chuvoso</b>	CN	16,0 ± 1,8	18,2 ± 1,7	2,8 ± 1,3	1,8 ± 0,7	38,8 ± 2,7	2,05
		CP	<b>39,8 ± 3,3*</b>	<b>32,7 ± 1,7*</b>	<b>8,3 ± 2,8*</b>	<b>8,7 ± 2,0*</b>	<b>89,5 ± 5,6*</b>	2,02
		Antes do tratamento	20,3 ± 3,0	22,7 ± 2,4	3,8 ± 2,0	<b>3,7 ± 1,0 *</b>	<b>50,7 ± 5,0 *</b>	2,06
		O <sub>3</sub> T1	20,3 ± 3,5	23,0 ± 2,8	4,8 ± 2,2	3,2 ± 2,4	51,3 ± 8,3	2,09
		O <sub>3</sub> T2	20,5 ± 3,4	23,0 ± 2,3	4,5 ± 1,4	3,5 ± 0,5	<b>51,5 ± 4,5 *</b>	2,15
		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1	19,0 ± 3,0	20,8 ± 3,0	4,5 ± 1,0	3,2 ± 1,2	48,3 ± 3,7	2,10
		UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2	21,2 ± 4,0	23,0 ± 3,2	5,0 ± 1,8	3,8 ± 1,7	<b>53,8 ± 5,7 *</b>	2,09
<b>Período seco</b>	CN	9,0 ± 2,6	5,3 ± 1,0	2,3 ± 2,0	0	16,7 ± 2,7	1,75	
	CP	<b>36,8 ± 3,2*</b>	<b>13,3 ± 4,1 *</b>	1,7 ± 1,2	1,2 ± 1,5	<b>53,0 ± 9,1 *</b>	1,86	
	Antes do tratamento	<b>22,0 ± 3,0*</b>	6,7 ± 2,3	0,7 ± 0,8	0,3 ± 0,5	29,7 ± 3,6	1,73	
	O <sub>3</sub> T1	<b>19,0 ± 3,3*</b>	6,5 ± 2,2	0,50 ± 0,84	0,33 ± 0,52	26,3 ± 4,7	1,75	
	O <sub>3</sub> T2	<b>19,7 ± 2,4*</b>	6,7 ± 2,8	0,33 ± 0,52	0,50 ± 0,84	27,2 ± 3,5	1,85	
	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1	<b>21,3 ± 3,1 *</b>	<b>12,7 ± 2,9* +</b>	2,17 ± 1,47	<b>2,3 ± 2,1* +</b>	<b>38,5 ± 6,8 *</b>	1,23	
	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2	<b>19,5 ± 2,9*</b>	<b>12,7 ± 3,5* +</b>	1,00 ± 0,63	1,50 ± 1,22	<b>34,7 ± 2,3 *</b>	1,28	
		<b>MN</b>	<b>Broto</b>	<b>Ponte</b>	<b>A.C.</b>	<b>Soma</b>	<b>CBPI</b>	

A.C.: alterações compostas; Total: soma de todas as alterações observadas; IPBC: Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese. O<sub>3</sub>: tratamento de ozonização; UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos. \* estatisticamente significativo quando comparado ao CN; + estatisticamente significativo quando comparado ao efluente antes da desinfecção, p < 0,05.

Com relação à presença de brotos nucleares, foram encontrados resultados significativos, em relação ao CN, para os tratamentos de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1 e T2 da ETE Municipal-período seco e para todos os tratamentos da ETE Unicamp. Segundo Fenech (2006) e Fernandes et al. (2009), os brotos nucleares podem ser originados de processos de remoção de DNA amplificado, sendo também um importante biomarcador de amplificação gênica. Quando realizada a comparação estatística entre as amostras, antes do tratamento e após os POAs, foram registrados resultados significativos para UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1 e T2 da ETE Municipal-período seco e para o tratamento de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1 da ETE Unicamp. Esses resultados mostram que os tratamentos que utilizaram radiação ultravioleta + peróxido de hidrogênio induziram maior formação de brotos nucleares nas amostras. Já, para a presença de pontes nucleoplasmáticas, não foram observados resultados significativos.

A presença de alterações compostas, que compreende mais de uma anormalidade encontrada em uma mesma célula binucleada (e.g. pontes cromossômicas e brotos nucleares (P+B); MN e brotos nucleares (MN+B); MN e pontes cromossômicas (MN+P); entre outras), foi estatisticamente significativa apenas para o tratamento UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>T1 da ETE Municipal-período seco, tanto quando comparado ao CN como ao efluente antes do tratamento. Quando a soma de todas as alterações observadas anteriormente foram consideradas como um único parâmetro (Tabela 6 – Total), os tratamentos que apresentaram resultados significativos, em relação ao CN, foram: UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para ambos os períodos (T1 e T2) da ETE Municipal -período seco; o efluente antes do tratamento; O<sub>3</sub>T2 e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T2 da ETE Municipal-período chuvoso; e todos os tratamentos da ETE Unicamp. No entanto, quando os resultados dos ensaios realizados com os efluentes antes do tratamento foram comparados com os das amostras após aplicação dos POAs, apenas o tratamento UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T1 da ETE Unicamp foi considerado estatisticamente significativo.

A genotoxicidade observada nas amostras de efluentes, antes da aplicação dos POAs, pode ser devido ao tratamento ineficiente realizado pelas ETES estudadas, mesmo considerando que essas ETES apresentem tratamentos distintos (reator anaeróbico de fluxo ascendente (RAFA) na ETE Unicamp e tratamento por lodo ativado na ETE Municipal). O tratamento pela tecnologia de RAFA ocorre em um reator fechado e o tratamento biológico é realizado na ausência de oxigênio, já, na de lodo ativado, o tratamento biológico é realizado na presença de oxigênio (MOTTA et al., 2007). Isso faz com que, dependendo das características dos contaminantes presentes nas águas residuais, o

tratamento seja mais, ou menos, efetivo, o que, conseqüentemente, pode influenciar no tratamento terciário. Esses resultados reforçam os dados já publicados por outros autores, que afirmam que as ETEs podem ser uma das principais fontes de poluição aquática (ESCHER et al., 2013; REEMTSMA et al., 2006; ZEGURA et al., 2009).

Além disso, foi observado uma maior toxicidade para os tratamentos com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que pode ser decorrente da formação de subprodutos tóxicos, devido a não mineralização dos contaminantes, neste tipo de tratamento (HERINGA et al., 2011). Guzzella et al. (2002) relataram em seus estudos realizados com *Salmonella typhimurium*, que os POAs (tratamentos com O<sub>3</sub>/UV e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV), possivelmente, aumentam a mutagenicidade da água tratada. Outras pesquisas também mostraram a formação de subprodutos tóxicos derivados de processos oxidativos e ainda relataram que os mesmos podem ser removidos, por meio de filtração com carvão ativado (GUZELLA et al., 2002; HERINGA et al., 2011; PENDERS et al., 2012).

A formação de subprodutos tóxicos também está relacionada com a composição da matriz da água (PARKINSON et al., 2001). As águas residuais são misturas bastante complexas, que incluem muitas substâncias que podem reagir com os contaminantes alvo ou com os seus intermediários derivados da oxidação, resultando num aumento da toxicidade (RIZZO et al. 2011). Alguns produtos gerados durante o tratamento de águas residuais, devido às reações de oxidação, como bromato (HOLLENDER et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2011), nitrosaminas (HOLLENDER et al., 2009; PETALA et al., 2008; SCHMIDT; BRAUCH. 2008), formaldeído e acetaldeído (CHAI et al., 2018) já foram relacionados como compostos que apresentam reatividade com a molécula de DNA.

Também já foi relatado no presente estudo, que a variação sazonal pode interferir nos resultados de genotoxicidade das amostras de efluentes, o que também foi visto no ensaio do MN. As amostras da ETE Municipal, coletadas no período seco, apresentaram um potencial genotóxico maior que as amostras coletadas no período chuvoso. Esse resultado está de acordo com as afirmações de Ergene et al. (2007), de que as concentrações de poluentes genotóxicos podem depender da pluviosidade, pois esse fenômeno pode interferir na diluição dos poluentes presentes na água.

Tang et al. (2014) estudaram poluentes orgânicos presentes nas águas residuais durante o tratamento secundário, seguido de osmose reversa e desinfecção por UV. Os autores avaliaram a toxicidade dos efluentes por meio de ensaios *in vitro* e monitoraram 299 compostos orgânicos. Foi observado que a eficiência na remoção de compostos

químicos orgânicos estava relacionada com a redução dos efeitos tóxicos observados nos bioensaios realizados. No entanto, os produtos químicos detectados explicaram muito pouco sobre as respostas tóxicas encontradas. Os autores observaram que os produtos químicos normalmente presentes nas águas residuais poderiam estar atuando de maneira aditiva na indução das respostas dos bioensaios. Dessa forma, devido à grande proporção de toxicidade desconhecida encontrado no estudo, os autores recomendaram a realização de um monitoramento de efeito biológico, para a complementação dos dados obtidos nos monitoramentos químicos.

Os resultados de genotoxicidade observados no presente estudo podem estar relacionados a uma infinidade de substâncias presentes nos efluentes, como compostos farmacêuticos, produtos químicos, pesticidas, entre outros, sendo a atividade genotóxica de tais misturas demonstrada por muitos estudos anteriores (HAMER et al. 2000; DIZER et al. 2002; DURUSOY; KAMBUR, 2003; ZEGURA et al. 2009).

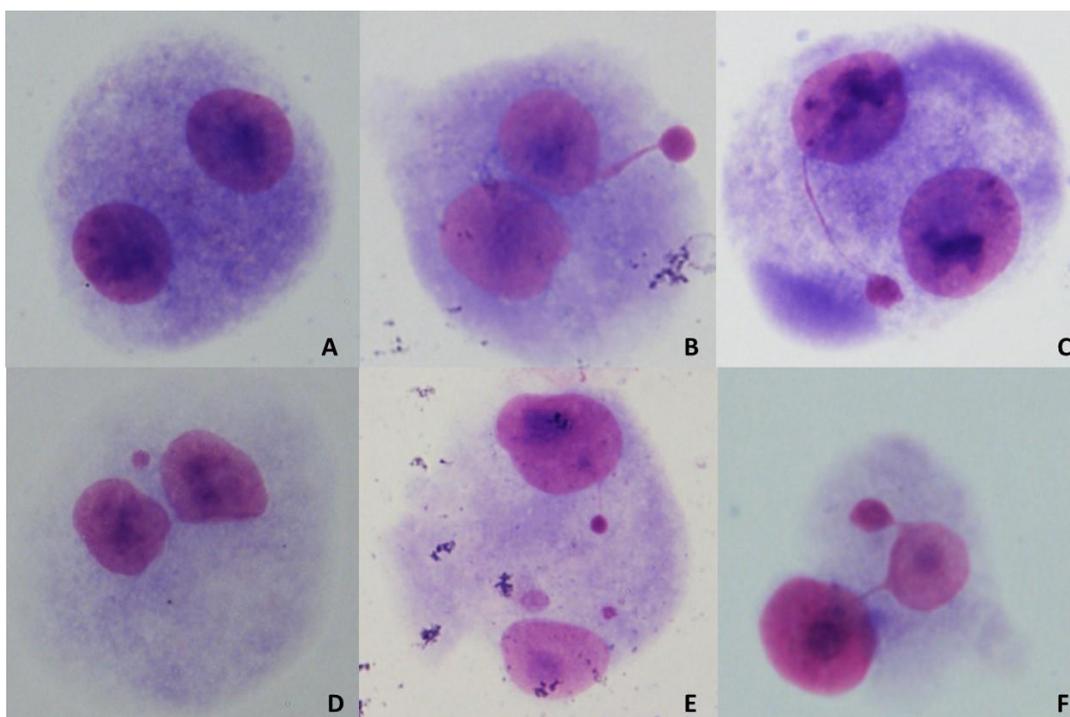
As atividades tóxicas e genotóxicas observadas para as águas residuais urbanas submetidas aos POA, poderiam induzir problemas de saúde humana e ambiental, devido à presença de subprodutos derivados do processo oxidativo. Portanto, esses parâmetros devem ser melhor avaliados e estudados com maior atenção. Neste sentido, seria interessante aumentar o período de exposição das células aos POAS e também aplicar um pós tratamento como carvão ativado, após o emprego dos POA.

Os avanços nas tecnologias de tratamentos das ETEs são cruciais para minimizar a carga de contaminantes emitidos pelo descarte de águas residuais nos corpos hídricos, bem como para aumentar as possibilidades de reuso seguro dos efluentes tratados. No entanto, um dos principais desafios das ETEs é a avaliação adequada das diferentes tecnologias de tratamento, para que sejam minimizados os riscos tanto para a biota, quanto para a saúde humana (PRASSE et al., 2015).

Neste estudo, foi observado que os POAs utilizados não diminuíram o potencial genotóxico das amostras, quando este já estava presente nos efluentes antes do processo de tratamento. Ainda, o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou maiores danos genotóxicos nas células HepG2/C3A, independente do período avaliado, quando comparado com os demais tratamentos. Uma outra preocupação com os tratamentos realizados nas ETEs é quanto a eficiência dos processos usados para a redução de microrganismos patogênicos, Este parâmetro deve ser considerado tanto sob ótica da contaminações de recursos hídricos, quando da reutilização dos efluentes em outras atividades humanas. Estudos realizados por Sommaggio et al. (2021) e Malvestiti e Dantas (2018) mostraram que o

tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mais eficiente na remoção dos microrganismos que a ozonização. Portanto, deve-se levar em consideração, não somente o poder desinfetante dos tratamentos, mas os possíveis efeitos biológicos que os efluentes derivados desse tratamento podem causar ao ambiente.

**Figura 4:** Células binucleadas avaliadas pelo ensaio de MN em células HepG2/C3A.



A: Célula binucleada normal; B e C: célula binucleada portadora de broto nuclear; D: célula binucleada portadora de MN; E: célula binucleada com alterações compostas (MN+broto); F: célula binucleada com alterações compostas (ponte+broto).

#### 4 Conclusões

A abordagem de monitoramento adotada nesta pesquisa, com a mensuração de alterações no crescimento radicular de *L. sativa* e dos efeitos genotóxicos em cultura de células metabolizadoras, parece ser uma ferramenta eficiente e capaz de fornecer resultados importantes para avaliação da fitotoxicidade e da genotoxicidade de águas residuais, tanto antes como após o emprego de POAs. Adicionalmente, o uso concomitante de diferentes testes de genotoxicidade, permite detectar diferentes respostas e modos de ação de contaminantes presentes em uma amostra e, conseqüentemente a uma melhor compreensão dos possíveis efeitos biológicos desencadeados por eles. Neste estudo, o ensaio do MN apresentou uma maior sensibilidade para a avaliação das amostras

estudadas que o ensaio do Cometa. No entanto, nenhum dos POAs empregados foi capaz de diminuir o efeito tóxico, quando este já estava presente no efluente secundário. Ainda, quanto a genotoxicidade, a ozonização se mostrou mais segura para ser usada em tratamento de águas residuais, que o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois, apesar o O<sub>3</sub> não diminuir o efeito genotóxico observado inicialmente nos efluentes, não induziu aumento deste potencial, como observado para o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Este estudo também comprovou que o tempo de aplicação e o tipo de POA utilizado tem relação direta com um aumento da genotoxicidade dos efluentes. Por esta razão, é muito importante a utilização de bioensaios diferentes, que possam avaliar de maneira mais eficiente, a melhor estratégia de uso dos POAs. Os ensaios realizados neste estudo comprovaram que a sazonalidade pode influenciar na qualidade do efluente da ETE e, conseqüentemente, na toxicidade e na genotoxicidade do mesmo.

É importante destacar ainda a necessidade de novos estudos empregando um tratamento adicional aos POA aqui estudados, para verificar se a toxicidade e a genotoxicidade observadas neste estudo poderiam ser minimizadas. Uma proposta para esse estudo seria a utilização de carvão ativado ou filtro de areia após aplicação dos POA. Após esse tratamento adicional, seria importante também a realização de novos estudos de genotoxicidade, para a certificação da sua eficiência na redução da toxicidade.

## 5. Referências

- BARCELO, D.; PETROVIC, M. Emerging contaminants in wastewaters: sources and occurrence: emerging contaminants from industrial and municipal waste—occurrence, analysis and effects. Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5. Part S1: Water Pollution. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1–36, 2008.
- BERETSOU, V. G. et al. A chemical, microbiological and (eco) toxicological scheme to understand the efficiency of UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation on antibiotic-related microcontaminants in treated urban wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 744, p. 140835, 2020.
- BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação da técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.
- CESAR, R.G.; EGLER, S.G.; POLIVANOV, H.; CASTILHOS, Z.C.; RODRIGUES, A.P.C.; ARAUJO, P.A. Biodisponibilidade de mercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuario do Instituto de Geociências**, v. 31, n. 2, p. 33-41, 2008.
- CHAI, Q. et al. A comparison of genotoxicity change in reclaimed wastewater from different disinfection processes. **Chemosphere**, v. 191, p. 335-341, 2018.

- CHARLES, J. et al. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 7, p. 2057-2064, 2011.
- CHOUDRI, B. S. et al. Wastewater treatment, reuse, and disposal-associated effects on environment and health. **Water Environment Research**, v. 92, n. 10, p. 1595-1602, 2020.
- CHUANG, Yi-H. ; et al. Comparing the UV/monochloramine and UV/free chlorine advanced oxidation processes (AOPs) to the UV/hydrogen peroxide AOP under scenarios relevant to potable reuse. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 23, p. 13859-13868, 2017.
- CIIAGRO. 2020. Climatological data. Available in: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QTmedPeriodo.asp>. Access: jun/2020.
- COELHO, L. H. G. et al. Estrogenic Hormones in São Paulo Waters (Brazil) and Their Relationship with Environmental Variables and *Sinapis alba* Phytotoxicity. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 4, p. 1-19, 2020.
- COORS, A. et al. Prospective environmental risk assessment of mixtures in wastewater treatment plant effluents—theoretical considerations and experimental verification. **Water research**, v. 140, p. 56-66, 2018.
- DANTAS, R.F., et al. Assessment of Cationic Surfactants Mineralization by Ozonation and Photo-Fenton Process. **Water Environ. Res.**, v. 81, n. 2, p. 201-205, 2009.
- DASH, A. K. Impact of domestic waste water on seed germination and physiological parameters of rice and wheat. **Int J Res Rev Appl Sci**, v. 12, n. 2, p. 280-286, 2012.
- DIZER, H. et al. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. **Chemosphere**, v. 46, n. 2, p. 225-233, 2002.
- DURUSOY, M.; KAMBUR, S. The application of the umu-test system for screening mutagenicity of surface water. **Turk. J. Biochem.** V. 28, p. 3–7, 2003.
- ERGENE, S.; et al. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, New York, v.16, p.385-391, 2007.
- ESCHER, B. I. et al. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 3, p. 1940-1956, 2013.
- ESCHER, B. I. et al. Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. **Science of the Total Environment**, v. 628, p. 748-765, 2018.
- ETCHEPARE, R., et al. Application of flocculation-flotation followed by ozonation in vehicle wash wastewater treatment/disinfection and water reclamation. **Desalination and Water Treatment**, v. 56, p. 1728-1736, 2014.
- FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37–59, 1995.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environ. Safety**, v.72, p. 1680-1686, 2009.

FOWLER, P. et al. Reduction of misleading (“false”) positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 742, n. 1-2, p. 11-25, 2012.

GIGER, W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 37–44, 2009.

GOONETILLEKE, A.; VITHANAGE, M. Water Resources Management: Innovation and Challenges in a Changing World. **Water**, v. 9, n. 4, p. 281, 2017.

GOPALAN, H. N. B. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 99-102, 1999.

GUZZELLA, L.; FERETTI, D.; MONARCA, S. Advanced oxidation and adsorption technologies for organic micropollutant removal from lake water used as drinking-water supply. **Water Research**, v. 36, n. 17, p. 4307-4318, 2002.

HAMER, B. et al. Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 466, n. 2, p. 161-171, 2000.

HARA, R.V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State–Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 2017.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v. 18, p. 45-51, 2003.

HARTMANN, A.; et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, Londres, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HERINGA, M.B.; et al. Formation and removal of genotoxic activity during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-GAC treatment of drinking water. **Water Res.**, v. 45, n.1, p. 366-374, 2011.

HEUSER, V.; ANDRADE, V; PERES, A.; BRAGA, L.; CHIES, J. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biol. Int.**, v.32, p. 1223-1229, 2008.

HOLLENDER, J. et al. Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 20, p. 7862-7869, 2009.

HUBER, M.M.; et al. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 4290-4299, 2005.

IAKOVIDES, I. C. et al. Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant *Escherichia coli* and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. **Water research**, v. 159, p. 333-347, 2019.

ISO, 1995. Soil quality—determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence of higher plants. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.

JOSS, A.; et al. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. **Water Research**, v.39, n.14, p. 3139-3152, 2005.

JRC. Something from Nothing? Ensuring the Safety of Chemical Mixtures. Doi: 10.2760/618648, 2018.

KASPRZYK-HORDERN B.; DINSDALE R.M.; GUWY, A.J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Res**, v.43, p.363–80, 2009.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 315-328, 2004.

KORTENKAMP, A.; FAUST, M. Regulate to reduce chemical mixture risk. **Science**, v. 361, n. 6399, p. 224-226, 2018.

KUMARAVEL, T.S.; et al. Comet assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology, Dordrecht**, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.

LAJMANOVICH, R.C.; et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutat. Res. Gen. Tox. Environ. Mut.** v. 769, p. 7-12, 2014.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 43–64, 2003.

LEE, Y.; ESCHER, B.I.; VON GUNTEN, U. Efficient removal of estrogenic activity during oxidative treatment of waters containing steroid estrogens. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n.17, p. 6333-6339, 2008.

LIM, M.H. Fate of Wastewater-Derived Contaminants In Surface Waters: Dissertation. University Of California, BERKELEY: 2008.

LIU, J.; et al. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicol. in Vitro**, v.26, p.841–8, 2012.

LOVEL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, Londres, v. 23, n.3, p. 171-182, 2008.

LUO, Y., et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment.. **Science of the total environment**, v. 473–474, p. 619-641, 2014.

MA, T.-H.; GRANT, W. F.; DE SERRES, F. J. The genotoxicity monitoring of air, water and soil-A preliminary report of the International Programme on Plant Bioassays (IPPB). **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 379, n. S1, p. S99-

S99, 1997.

MACOVA, M., et al. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. **Water research**, v. 44, n. 2, p. 477-492, 2010.

MAGDEBURG, A.; STALTER, D.; OEHLMANN, J. Whole effluent toxicity assessment at a wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation using aquatic key species. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 1008-1014, 2012.

MALVESTITI J.A., et al. Optimization of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone wastewater treatment by the experimental design methodology, *Environmental Technology*, v. 40, n.15, p. 1910-1922, DOI: 10.1080/09593330.2018.1432698, 2019.

MALVESTITI, J.A.; DANTAS, R F. Disinfection of secondary effluents by O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Influence of carbonate, nitrate, industrial contaminants and regrowth. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, n. 1, p. 560-567, 2018.

MANZANO, B.C. et al. Evaluation of the genotoxicity of Waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, p. 1399–1407, 2015.

MARIA, I. C.; KOCSSI, M. A.; DECHEN, S. C. F. Agregação do solo em área que recebeu lodo de esgoto. **Solos e Nutrição de plantas**, Bragantia, v. 66, p. 291-298, 2007.

MAZZEO, D. E. C., et al. Detoxification of sewage sludge by natural attenuation and implications for its use as a fertilizer on agricultural soils. *Science of The Total Environment*, v. 572, p. 978-985, 2016

MELO, S. A. S. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MIŠÍK, M. et al. Genotoxic activities of wastewater after ozonation and activated carbon filtration: Different effects in liver-derived cells and bacterial indicators. **Water Research**, v. 186, p. 116328, 2020.

MIŠÍK, M. et al. Use of human derived liver cells for the detection of genotoxins in comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 845, p. 402995, 2019.

MOTTA, E. J. et al. Combined anaerobic/aerobic secondary municipal wastewater treatment: pilot-plant demonstration of the UASB/aerobic solids contact system. **Journal of environmental engineering**, v. 133, n. 4, p. 397-403, 2007.

MOTULSKY, H.; BROWN, R. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BCM Bioinformatics**, Londres, v. 7, p. 123-143, 2006.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, p. 399-403, 1991.

NEVES, L. C. et al. Phytotoxicity indexes and removal of color, COD, phenols and ISA from pulp and paper mill wastewater post-treated by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, p. 110939, 2020.

OECD, 2003. Organisation for Economic Cooperation and Development: OECD guideline 208. Terrestrial plant test: 208; Seedling emergence and seedling growth test

OECD, 2016a. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264885-en>.

OECD, 2016b. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.

OECD, 2017. Diffuse Pollution, Degraded Waters: Emerging Policy Solutions, OECD Studies on Water, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264269064-en>.

OLESZCZUK, Patryk. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 496-505, 2008.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT- OECD. In vitro mammalian cell micronucleus test, 2010.

PARKINSON, A.; et al. Preliminary toxicity assessment of water after treatment with UV-irradiation and UVC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Water Res.**, v. 35, n.15, p. 3656-3664, 2001.

PEDRAZZANI, R. et al. Opinion paper about organic trace pollutants in wastewater: Toxicity assessment in a European perspective. **Science of the total environment**, v. 651, p. 3202-3221, 2019.

PEDROZA, M. M.; et al. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. **Revista Liberato**, v. 17, p. 89-188, 2010.

PENDERS, E.J.M.; et al. Genotoxicity testing of samples generated during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of surface water for the production of drinking water using the Ames test in vitro and the Comet assay and the SCE test in vivo. **J. Water Supp. Res. Technol.**, v. 61, n.7, p. 435-445, 2012.

PEREDA, Olatz et al. Impact of wastewater effluent pollution on stream functioning: A whole-ecosystem manipulation experiment. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113719, 2020.

PETALA, M. et al. Influence of ozonation on the in vitro mutagenic and toxic potential of secondary effluents. **Water Research**, v. 42, n. 20, p. 4929-4940, 2008.

PIGNATELLO, J.J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. Critical Review. **Environ. Sci. Technol.**, v.36, p.1-84, 2006.

PILLON, A.; et al. Binding of Estrogenic Compounds to Recombinant Estrogen Receptor- $\alpha$ : Application to Environmental Analysis. **Environ. Health Perspectives**, n. 3, p. 278-84, 2005.

PRASSE, C.; STALTER, D.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J.; TERNES, T. A. Spoilt for choice: a critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment Technologies. **Water research**, v. 87, p. 237-270, 2015.

RAGAZZO, P.; et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. **Water Res.**, v. 116, p. 44-52, 2017.

RAGAZZO, Patrizia et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. **Water research**, v. 116, p. 44-52, 2017.

REEMTSMA, T.; et al. Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: a european perspective. **Environ. Sci. Technol**, v.40, p. 5451-5458, 2006.

REIFFERSCHIED, G. et al. Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test—results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 649, n. 1-2, p. 15-27, 2008.

REISINGER, K.; et al. Validation of the 3D skin comet assay using full thickness skin models: transferability and reproducibility. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdã, v. 827, p. 27-41, 2018.

REUNGOAT, J.; et al. Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. **Water Res.**, v. 44, p. 625-637, 2010.

RIBEIRO, Ana R. et al. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. **Environment international**, v. 75, p. 33-51, 2015.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water res.**, v. 45, n. 15, p. 4311-4340, 2011.

ROULEAU, S.; LESSARD, P., BELLEFLEUR, D. Behaviour of a small wastewater treatment Plant during rain events. **Can. J. Civ. Eng.** 24 (5), p.790-798, 1997.

SAI, Y.; TAO, H. Ecological security of wastewater treatment processes: A review. **Chinese Journal of Applied Ecol.**, v. 24, n.5, p.1468-1478, 2013.

SALGOT, M.; FOLCH, M. Wastewater treatment and water reuse. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 2, p. 64-74, 2018

SANTOS, A. S. P.; et al. Capacidade de reuso de efluentes de estações de tratamento de esgoto na bacia hidrográfica do paraíba do sul. **Semioses**, v. 12, n. 3, p. 16-33, 2018.

SCHMIDT, C.K.; BRAUCH, H-J. N, N-dimethylsulfamide as precursor for N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation upon ozonation and its fate during drinking water treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 17, p. 6340-6346, 2008.

SHAO, Ying et al. Integrating bioassays, chemical analysis and in silico techniques to identify genotoxicants in surface water. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 3084-3092, 2019.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 241-245, 2000.

SINGH, N.P.; et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184–191, 1988.

- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA. Canadá, Capítulo, v. 4, p. 71-79, 2004.
- SOLAIMAN, Z. M.; MURPHY, D. V.; ABBOTT, L. K. Biochars influence seed germination and early growth of seedlings. **Plant and soil**, v. 353, n. 1, p. 273-287, 2012.
- SOMMAGGIO, L. R. D.; et al. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere**, v. 199, p. 10-15, 2018.
- STASINAKIS, A.S. et al. Contribution of primary and secondary treatment on the removal of benzothiazoles, benzotriazoles, endocrine disruptors, pharmaceuticals and perfluorinated compounds in a sewage treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 463, p. 1067-1075, 2013.
- TANG, J. Y.M., et al. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water?. **Water research**, v. 60, p. 289-299, 2014.
- TAVARES, M. G. ; et al. Efficiency and toxicity: comparison between the Fenton and electrochemical processes. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 5, p. 1143-1154, 2016.
- TIBURTIUS, E. R. L, et al. Degradação de BTXS via processos oxidativos avançados. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 61-64, 2005.
- TICE, R. R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H.;
- VENITT, S. (Eds.), **Environmental Mutagenesis**. **Bios Scientific Publishers**, Oxford. p. 315-339, 1995.
- TICE, R.R.; et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, Wilmington, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- UNESCO – United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization . UN-WATER: The United Nations World Water Development Report 2020: Water and climate change, Paris, UNESCO, 2020.
- USEPA, 1996. Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination/root elongation toxicity test.
- VÄLITALO, P. et al. Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents. **Water research**, v. 88, p. 740-749, 2016.
- VIENO, N. M.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 21, p. 8220-8226, 2005.
- WANG, J.; et al. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, Amsterdã, v. 144, p. 510-517, 2016.
- WEF (World Economic Forum). 2019. The Global Risks Report 2019. Fourteenth Edition. Geneva, WEF. [www.weforum.org/reports/the-globalrisks-report-2019](http://www.weforum.org/reports/the-globalrisks-report-2019), 2019

WESTERINK, W. M. A. et al. Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p. 7-21, 2011.

WESTERINK, W.M.A.; et al. The development of RAD51C, cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. **Mutat. Res.**, v.696, p.21-40, 2010.

YANUARYSKA, R.D. Comet assay assessment of DNA damage in buccal mucosa cells exposed to X-Rays via panoramic radiography. **Journal of Dentistry Indonesia**, Jakarta, v. 25, n. 1, p. 53-57, 2018.

YOUNG, B. J., et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.

ZEGURA, Bojana et al. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453-1460, 2009.

ZIMMERMANN, S. G. et al. Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection. **Water research**, v. 45, n. 2, p. 605-617, 2011.

### Artigo 3

---

#### **Investigação dos potenciais estrogênicos e mutagênicos de efluentes secundários tratados por processos oxidativos avançados**

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) não eliminam completamente os micropoluentes, o que torna seu efluente final uma fonte pontual de contaminação desses químicos no ambiente aquático. Dentre os microcontaminantes, estão os alteradores endócrinos (AEs), que são compostos que podem interferir no sistema endócrino de muitos organismos, incluindo os seres humanos. Os processos oxidativos avançados (POAs) podem, além de desinfetar os efluentes de esgoto, degradar os microcontaminantes presentes em águas residuais. No entanto, a oxidação inespecífica realizada por esse tipo de tratamento pode resultar em subprodutos finais mais tóxicos que os originais. Ferramentas bioanálíticas, como os bioensaios com leveduras recombinantes, são úteis para avaliar o potencial estrogênico de amostras ambientais, como os efluentes de ETEs. Outra técnica interessante para avaliar a qualidade desses efluentes é o ensaio com *Salmonella*/microssoma. Estes testes de mutagenicidade e de AEs são recomendados para a avaliação da toxicidade de misturas complexas, portanto indicados para serem aplicados em efluentes secundários de ETEs. Efluentes de duas ETEs foram avaliados, antes e após serem submetidos aos POAs, quanto ao seu potencial estrogênico e mutagênico. Os resultados mostraram que os efluentes antes do tratamento convencional das ETEs e após aplicação de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na maioria das coletas, apresentaram atividade estrogênica. No entanto, os efluentes submetidos a ozonização não demonstraram atividade estrogênica detectável. No teste *Salmonella* foi observado potencial mutagênico (TA98 e TA100, com ativação metabólica) para as amostras tratadas com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assim, o tratamento com ozônio pareceu reduzir o potencial estrogênico das amostras estudadas e não levou a formação de subprodutos com potenciais mutagênicos. Já, o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foi eficiente para inativação da atividade estrogênica, bem como gerou subprodutos com características mutagênicas. Estes resultados mostram que, para assegurar a qualidade ambiental e a saúde humana, é de fundamental importância que os efluentes tratados com POA sejam avaliados, quanto às suas atividades biológicas, antes dos mesmos serem lançados nos corpos hídricos ou reutilizados em outras atividades humanas.

**Palavras-chave:** tratamento de efluentes, águas residuais, ozonização, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, YES, *Salmonella*/microsossoma.

## 1. Introdução

Os contaminantes emergentes (CE), também conhecidos como microcontaminantes, representam, nas últimas décadas, uma das principais fontes de contaminação dos recursos hídricos, devido à frequência com que são detectados e aos riscos que podem causar aos organismos expostos, mesmo em baixas concentrações. Esses compostos são de origem orgânica ou inorgânica e, no ambiente aquático, são encontrados na ordem de µg/L e ng/L (COELHO et al., 2020). Dentre esses contaminantes, destacam-se uma grande variedade de compostos naturais e sintéticos, como produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, hormônios, surfactantes, retardadores de chama, pesticidas e nanopartículas (BARCELÓ; PETROVIC, 2008; QUADRA et al., 2017), dos quais, alguns são capazes de alterar as funções endócrinas dos organismos, sendo denominados como alteradores endócrinos (AEs) (RANI; KARTHIKEYAN, 2016; ADEEL et al., 2017). Os AEs podem causar efeitos adversos sobre os ecossistemas aquáticos e a saúde humana, afetando, principalmente, a reprodução, crescimento e desenvolvimento de muitas espécies, além de estarem relacionados a doenças humanas como câncer e infertilidade (AWWA, 2005).

Os tratamentos convencionais realizados nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) são, geralmente, ineficientes na remoção de CE, o que coloca essas atividades entre as principais fontes antrópicas de liberação desses poluentes no ambiente (RIZZO et al., 2019). Assim, a aplicação de processos adicionais, como os Processos Oxidativos Avançados (POAs), após a etapa de tratamento convencional nas ETEs, pode ser uma estratégia para a remoção mais completa e efetiva dessas substâncias dos seus efluentes finais (ZHANG; ZHOU, 2008).

Frente ao cenário atual de má gestão e a conseqüente má qualidade da água, somado ao estresse hídrico de várias regiões, o reúso de efluentes de ETEs é uma alternativa importante para uso racional da água, pois essa prática pode diminuir os impactos desses efluentes no meio ambiente e reduzir a captação de água nos mananciais (SANTOS et al., 2018). Desta forma, é muito importante a incorporação de novos processos de tratamento, já que esses processos podem melhorar a remoção dos contaminantes químicos e microbiológicos (RAGAZZO et al., 2017; National Research

Council, 2012; GERRITY et al., 2013) e, assim, garantir um efluente de qualidade e adequado para o reuso.

Os processos oxidativos avançados (POA), como ozonização ou radiação UV-C combinada ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são indicados como tratamentos terciários de efluentes, devido à formação de radicais hidroxilas que melhoram a capacidade de desinfecção, pela inativação dos microrganismos, e aumentam a degradação dos microcontaminantes de águas residuais (BERETSOU et al., 2020; MALVESTITI; DANTAS, 2018). No entanto, a dose ideal dos oxidantes e a mineralização completa dos poluentes depende de vários fatores, como as características das águas residuais, que podem conter uma infinidade de interferentes (como íons metálicos, nitratos etc.); tipo e potência da lâmpada utilizada; projetos específicos dos reatores; reatividade dos contaminantes ao radical hidroxila, entre outros (BERETSOU et al., 2020; MALVESTITI; DANTAS, 2018 e 2019).

Ao investigar as condições operacionais de POAs, é importante considerar a eficiência do tratamento na diminuição da bioatividade, os efeitos tóxicos potenciais das substâncias presentes nos efluentes, bem como os produtos da transformação gerados pela oxidação da matéria orgânica dissolvida e dos micropoluentes presentes nas águas residuais (JIA et al., 2015). Essa avaliação é importante pelo fato dos efluentes de ETEs serem matrizes complexas, cujas substâncias podem apresentar possibilidades de interação. Alguns estudos destacam que a exposição combinada de várias substâncias pode levar a efeitos adversos cumulativos nos ecossistemas e à saúde humana, mesmo que as substâncias isoladas encontrem-se dentro dos seus limites de segurança individuais (JRC; 2018; KORTENKAMP, FAUST, 2018). Dessa forma, para se obter informações mais consistentes e gerais dos efeitos biológicos das águas residuais, é necessário investigar não apenas os impactos de contaminantes isolados, mas utilizar ferramentas bioanalíticas, que possam estimar os efeitos associados dos contaminantes presentes na amostra (NEALE et al. 2015, PEDRAZANNI et al., 2019). Bioensaios *in vitro* são importantes ferramentas analíticas para a descrição de efeito de toxicidade de misturas complexas (BERETSOU et al., 2020). Além disso, eles podem fornecer informações sobre as características dos compostos presentes nas amostras, de acordo com a ação tóxica apresentada (ESCHER, LEUSCH, 2011).

Muitos estudos que avaliam a remoção dos microcontaminantes em tratamentos de águas residuais são realizados somente por análises químicas (ZHANG; ZHOU 2008; NAKADA et al., 2006; KUMAR et al., 2011), que contemplam alguns compostos pré-

determinados, negligenciando ou não considerando, muitos produtos de transformação (SCHULZ et al., 2008). Além disso, as análises químicas apresentam um alto custo, e muitas dessas análises de amostras ambientais acabam sendo deficientes na identificação dos contaminantes, principalmente quando o composto se apresenta em concentração extremamente baixa, como, por exemplo, dos microcontaminantes (VIRKUTYTE; VARMA, 2010; SONMEZ et al., 2012).

Bioensaios, como o de mutagenicidade de *Salmonella*/microsossoma, produzem respostas interessantes sobre a avaliação de misturas complexas, sem o conhecimento prévio da composição da amostra (WHITE; CLAXTON et al., 2004; MAZZEO, FERNANDES, MARIN-MORALES, 2016). O mesmo acontece com os ensaios realizados com leveduras recombinantes, portadoras do receptor de estrogênio de vertebrados, que são utilizados como ferramentas na avaliação do potencial de desregulação endócrina de contaminantes (GARCIA-REYERO et al., 2001; MAZZEO et al., 2016; BAZIN et al., 2017).

Ao sugerir uma nova tecnologia de tratamento para uma ETEs, é necessário avaliar, posteriormente à aplicação do tratamento proposto, a presença de compostos biologicamente ativos, que possam ter sido gerados durante o processo. Alguns bioensaios são indicados para esse fim, pois fornecem informações sobre a ação dos contaminantes presentes na mistura, o que facilita a tomada de decisões para a realização de ajustes, tanto nas etapas do processo como do tempo de reação adotados, possibilitando, assim, a minimização de possíveis efeitos adversos ao ambiente e à saúde humana. O presente estudo avaliou os efeitos do uso de tecnologias oxidativas (POAs) no tratamento de efluentes secundários, por meio de investigação de atividades biológicas relacionada à presença de substâncias potencialmente estrogênicas e/ou mutagênicas. Frente à dificuldade de caracterização química dessa matriz altamente complexa, devido aos subprodutos da oxidação serem muito variáveis e dependentes do tipo de tecnologia adotado, foram realizados bioensaios com leveduras recombinantes e com linhagens de *Salmonella typhimurium*, para identificar compostos com potenciais estrogênicos e mutagênicos, respectivamente.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Amostras de efluentes secundários

Amostras de efluentes secundários foram coletadas em duas ETEs da cidade de Limeira (SP-Brasil). Foram realizadas duas amostragens para cada ETE, sendo uma representativa de período chuvoso, realizada em dezembro de 2018, e outra representativa de período seco, realizada em julho de 2019 (informações sobre precipitação e temperatura estão apresentadas na Tabela 1). As características das ETEs estudadas, bem como as especificações dos seus efluentes estão dispostas a seguir:

a) ETE Unicamp: ETE Piloto da Faculdade de Tecnologia da Universidade de Campinas, campus de Limeira, a qual utiliza Tecnologia RAFA (reator anaeróbio de fluxo ascendente) para tratamento biológico. Este efluente apresenta uma composição constante e homogênea, por ter apenas esgoto sanitário, resíduos do restaurante universitário e águas servidas dos laboratórios da Universidade.

b) ETE Municipal Águas da Serra: ETE responsável por parte do tratamento de esgoto da cidade de Limeira (SP-Brasil), que possui cerca de 276 mil habitantes. Essa ETE, que se encontra em operação desde 2010, realiza tratamento primário, seguido de tratamento secundário com lodo ativado. Sua vazão é de 76 L/s.

Todas as amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar (capacidade de 4L), previamente higienizados e identificados. Após a coleta, os efluentes secundários foram imediatamente submetidos aos tratamentos oxidativos avançados no laboratório da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP/Limeira.

**Tabela 1:** Precipitação média em milímetros de chuva e temperatura média (°C) mensal dos anos em que foram realizadas as coletas.

Precipitação (mm)												
Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<b>2018</b>	155,2	83,8	140,6	41,7	26,7	9,3	2,5	99,8	83,9	215,9	172,9	<b>140,8</b>
<b>2019</b>	113,5	201,6	164,2	156,2	25	12,5	<b>26,5</b>	14,6	34,1	67,2	154,5	149,2
Temperatura (°C)												
Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<b>2018</b>	23,2	22,5	24,2	20,9	18,3	18,7	18,4	17	19,8	21,5	22	<b>23,4</b>
<b>2019</b>	24,9	23,7	23,2	22,1	20,3	18,2	<b>16,6</b>	18,2	20,8	23,8	23	23,2

Fonte: CIIAGRO, 2020; Fontes em negrito: data em que foram realizadas as coletas.

## 2.2 Processos oxidativos avançados: ozonização e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Os experimentos foram realizados em escala de bancada e de modo independente, utilizando os dispositivos experimentais descritos por Malvestiti e Dantas (2018) e Malvestiti et al., (2018). Resumidamente, os tratamentos aplicados nos efluentes foram:

- Ozonização (O<sub>3</sub>): 2 litros da amostra foram submetidos ao tratamento com ozônio, em um reator cilíndrico de vidro ligado a um gerador de ozônio (Ozonar GT 8000, Brazil). A dose de ozônio utilizada foi de 5 e 10 mg/L, com taxa de fluxo de 4 L/minutos.
- Tratamento com radiação ultravioleta associada a peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 1 litro de amostra do efluente foi submetida ao tratamento com radiação UV-C e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dose de 90 mg/L), por meio de um tanque de recirculação, sob agitação constante, em um fotorreator UV-C (capacidade de 150 mL), operando em recirculação contínua. O fotorreator apresentava uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão (5W), que emitia radiação em um comprimento de onda de 254 nm e um fluxo fotônico de cerca de  $9,5 \times 10^{-7}$  Einstein s<sup>-1</sup>.

Para cada um dos tratamentos oxidativos, foram aplicados dois tempos de reação: T1, que correspondeu a 20 minutos de reação, e T2, a 40 minutos de reação. Após as exposições aos POAs, foram coletadas amostras dos efluentes tratados e encaminhadas para o processo de extração em fase sólida. A escolha do tempo de reação de 40 minutos foi recomendada por Malvestiti e Dantas (2018), pois, segundo os autores, este período é ideal para a completa desinfecção do organismo indicador *Escherichia coli* do efluente. O tempo de 20 minutos foi escolhido como um período intermediário para avaliar se há diferenças na toxicidade do efluente no decorrer do tempo de reação.

## 2.3 Extração das amostras

Logo após os tratamentos oxidativos, as amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro (47mm de diâmetro, grau MGA, marca *Sartorius stedim biotech*). A concentração das amostras foi realizada passando 500 mL de cada amostra em cartucho Oasis HLB (500 mg, 6 mL-Waters, Milford, MA, EUA), pré-condicionados em 6 mL de metanol (grau HPLC) e 6 mL de água ultrapura. Após a passagem das amostras pelos cartuchos, esses foram completamente secos. Para a obtenção dos extratos, os cartuchos foram eluídos, sequencialmente, com 7,5 mL de éterdietílico, 7,5 mL de acetato de etila e 4 x 1 mL de metanol. Todos os reagentes apresentavam grau HPLC. Em seguida, os extratos foram secos sob fluxo suave de nitrogênio gás. Posteriormente, os materiais

foram ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  de DMSO, o que resultou em um extrato concentrado 1000X. Os extratos foram mantidos em frascos de vidro âmbar e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a realização dos ensaios.

## 2.4 Bioensaios

### 2.4.1 Ensaio de estrogenicidade - Yeast Estrogen Screen (YES)

O ensaio de estrogenicidade utiliza uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (YES) transfectada com receptor  $\alpha$  de estrogênio humano (hER  $\alpha$ ). A ativação desse receptor nestas leveduras induz a expressão do gene repórter  $\beta$ -galactosidase, a qual pode ser quantificada pela adição de um substrato fluorogênico e mensurada por um leitor de microplacas.

Neste estudo, os ensaios de estrogenicidade foram realizados de acordo com os protocolos descritos por Wagner e Oehlmann (2009) e Völker et al. (2016). Os tratamentos foram preparados em meio 5x, contendo 1% (v/v) das amostras (diluição do extrato de 100x). O controle negativo foi realizado com o meio 5x e o controle positivo com uma diluição de  $17\beta$ -estradiol em meio 5x (em 1% v/v de etanol, 3pM-100nM concentração). Foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 25  $\mu\text{L}$  das respectivas amostras ou controle e 20  $\mu\text{L}$  do cultivo celular (com exceção dos poços referentes ao branco) em cada um dos poços de uma placa de 96 poços. Em cada placa, foram dispostas 8 réplicas de cada amostra. As placas de 96 poços foram seladas com uma membrana semi-permeável (Breathe-Easy, Diversified Biotech, Boston, MA, USA), para evitar evaporação das amostras, e incubadas sob agitação, por 20 horas, a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para verificar o potencial citotóxico de cada amostra, o número de células foi determinado fotometricamente a 595 nm. Apenas amostras com viabilidade celular superior a 75% foram avaliadas, quanto ao seu potencial estrogênico. Posteriormente, 30  $\mu\text{L}$  da solução presente em cada poço foi transferida para o poço correspondente de uma placa de 96 poços preta e 50  $\mu\text{L}$  do substrato fluorescente (4-methyl-umbelliferone  $\beta$ -D-galactopiranoside) foram adicionados em cada poço. As placas retornaram para a incubadora, nas mesmas condições, por 1 hora. A atividade do gene repórter foi medida em um leitor de microplacas (marca TECAN, modelo infinite M200PRO), com um comprimento de onda de 360 nm para excitação e de 465 nm para emissão. Esses ensaios foram realizados em duplicatas, de maneira independente, totalizando, 16 réplicas para cada amostra.

Para a análise dos resultados, as densidades ópticas foram corrigidas de acordo com os valores do branco e da densidade celular relativa. Foi calculada, para cada medição, a relação dose-resposta para o 17 $\beta$ -estradiol (ligante referência), usando uma função logarítmica do Software GraphPad Prism 9.0. A atividade agonista de cada amostra foi expressa como concentração equivalente (EQ) da concentração do ligante referência 17 $\beta$ -estradiol.

#### 2.4.2 Ensaio de microssuspensão com *Salmonella* – Teste de Kado

Para a avaliação da mutagenicidade das amostras de efluentes tratados com POAs, foram realizados ensaios com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, com presença e ausência de fração metabolizadora, as quais detectam mutações no quadro de leitura e mutações por substituição nos pares de base, respectivamente. Esse ensaio foi baseado em Kado, Langley e Eisenstadt (1983). As cepas foram colocadas para crescer em incubadora shaker a 37 °C, *overnight*, em caldo nutriente. As culturas de *Salmonella* foram centrifugadas a 10 000g a 4 °C, por 10 minutos, para ressuspensão do pellet em tampão fosfato de sódio (0,15 M). Esse processo é realizado para concentrar em 10X a cultura de *Salmonella*. Foram adicionados, em tubos de ensaio, 100  $\mu$ L de cada linhagem (10<sup>10</sup> células/mL) contendo 100  $\mu$ L de tampão fosfato 0,1M e 100  $\mu$ L de amostra, previamente preparadas em 6 diluições diferentes. Para o controle negativo (CN), foi utilizado 100  $\mu$ L de água ultrapura, e para os controles positivos (CP), óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No, 56-57-5), na concentração de 0,5  $\mu$ g/placa, para os testes realizados na ausência de ativação metabólica, e 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No, 613-13-8), na concentração de 0,25  $\mu$ g/placa, para os testes realizados na presença de ativação metabólica. Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9 (sistema microssomal S9, Moltox, Aroclor-1254 proveniente de fígado de rato), o tampão fosfato foi substituído por 100  $\mu$ L de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl<sub>2</sub> 0,4M) e fração S9]. Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados a 37 °C, por 90 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis, contendo ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 72 horas. Os ensaios foram realizado em triplicata.

Devido à complexidade e custo do ensaio, foram escolhidos, para o teste com *Salmonella*, os extratos das amostras da ETE que apresentaram resultados significativos

para estrogenicidade e apenas o período de 40 minutos (T2), tanto para ozonização (O<sub>3</sub> T2) como para radiação UV/peróxido de hidrogênio (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> T2), pois seria o tempo de tratamento recomendado para desinfecção do efluente (avaliação do indicador bacteriano *E. coli*). Para cada uma das amostras testadas, foram realizadas 6 diluições dos extratos em água ultrapura. Essas diluições foram realizadas a partir da diluição utilizada no ensaio com leveduras recombinantes (480X), dessa forma, foram estabelecidas diluições menores e maiores, resultando nas seguintes 60X; 120X; 240X; 480X; 960X; 1920X, que foram utilizadas no ensaio com *Salmonella*.

Para as análises de mutagenicidade, foram contadas, manualmente, as colônias de bactérias revertentes. Os dados foram analisados pelo software estatístico Salanal (Salmonella Assay Analysis 1.0) (BERNSTEIN et al., 1982), utilizando a análise de variância ANOVA (F-teste), seguido por regressão linear (MOREIRA et al., 2002; ANDRADE et al., 2011). A amostra foi considerada como indicativa de mutagenicidade, quando os resultados foram significativos ( $p < 0,05$ ), para ambas as análises estatísticas realizadas. O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado pelo número de colônias revertentes da placa do tratamento, dividido pelo número de revertentes espontâneos da placa controle. A potência mutagênica foi calculada por meio da regressão linear da curva dose-resposta, e expressa, quantitativamente, em número de revertentes/mL de extrato.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Ensaio de estrogenicidade**

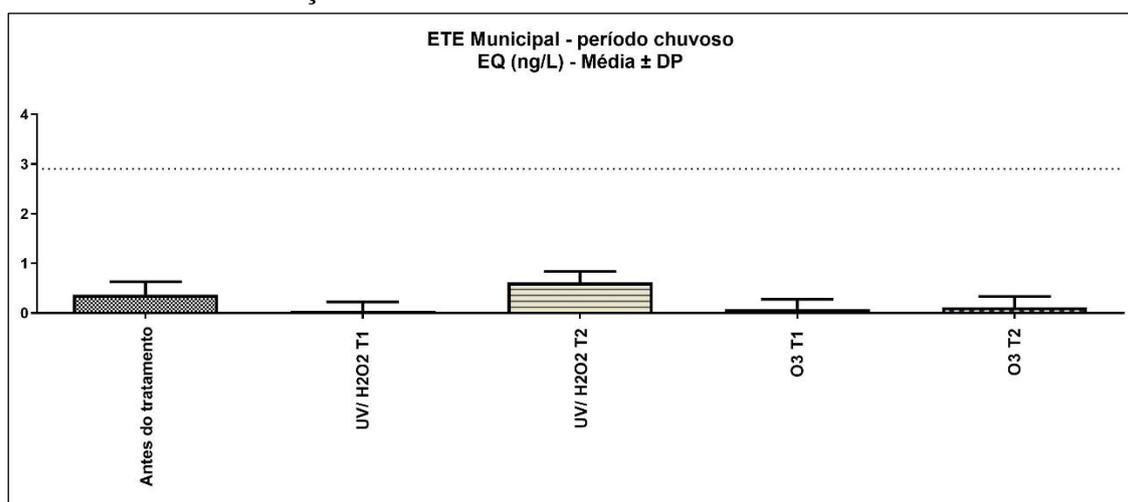
Muitos estudos registraram a presença de substâncias com potencial estrogênico em ecossistemas aquáticos receptores de efluentes de estações de tratamento de águas residuais urbanas e industriais (AURIOL et al., 2006; KIRK et al., 2002; SERVOS et al., 2005; KESSABI et al., 2010; KESSABI et al., 2013; ZHOU et al, 2010; ANDERSEN et al, 2003; NACADA et al, 2006).

Nenhuma das amostras analisadas no presente estudo foi considerada citotóxica para as leveduras. Os resultados referentes a concentração de estrogênio equivalente estão apresentados nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Para a ETE Municipal-período chuvoso (Figura 1) não foram encontradas atividades estrogênicas para nenhuma das amostras testadas, mostrando que, nessa coleta, não houve interferência de substâncias com potenciais estrogênicos. Esses resultados podem ser devidos à eficiência do tratamento secundário, realizado por lodo ativado dessa

ETE, que foi capaz de reduzir ou eliminar os contaminantes do efluente final. A remoção de compostos estrogênicos em tratamentos com lodo ativado pode estar relacionada com mecanismos de biodegradação, promovidos pela biota do lodo, e/ou pela adsorção do contaminante ao lodo (AURIOL et al., 2006). Kirk et al. (2002) estudaram, pelo ensaio com levedura recombinante, as atividades estrogênicas de águas residuais de 5 ETEs. Os autores notaram que as ETEs que possuíam tratamento secundário por lodo ativado apresentaram uma redução de 70% ou mais na atividade estrogênica, sendo que, em algumas amostras houve uma redução dessa atividade a um nível indetectável pelo ensaio. Além disso, os períodos chuvosos podem reduzir a concentração de contaminantes das águas, devido à maior diluição dos compostos presentes (LING et al., 2017).

**Figura 1:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L), para extratos das amostras da ETE Municipal período chuvoso. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.



Foram observados resultados significativos de estrogenicidade para as amostras coletadas antes do tratamento e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T1 e T2) na ETE Municipal, no período seco. Os resultados obtidos para as amostras antes do tratamento podem estar relacionados com a alta concentração desses tipos de contaminantes nas águas residuais, que entraram na ETE Municipal e não foram efetivamente removidos pelo tratamento secundário. Já foram relatadas diferenças no potencial estrogênico de amostras de ETE decorrentes da sazonalidade, como, por exemplo, amostras coletadas na estação seca apresentaram maior atividade estrogênica, pelo ensaio com leveduras, que as coletadas no período chuvoso (KIRK et al., 2002). Um estudo realizado na Tunísia mostrou uma melhor remoção de compostos estrogênicos alvos ( $\geq 80\%$ ), durante o verão. Os autores relacionaram essa

eficiência na remoção à melhor atividade microbiológica do lodo em períodos com temperaturas mais altas (BELHAJ et al, 2015). Yu, Wu e Chang (2013) observaram uma maior concentração de compostos farmacêuticos e de cuidados pessoais durante o inverno e relacionaram isso ao padrão de consumo desses produtos nessa época. Além disso, os autores acreditam que, durante o verão, pode haver uma degradação mais rápida desses compostos.

Estudos realizados por Pessoa et al. (2014), em diferentes ETEs brasileiras, mostraram altas concentrações de compostos estrogênicos nas amostras estudadas, quando comparado a de outros estudos descritos na literatura. Os pesquisadores relacionaram as concentrações mais elevadas de compostos estrogênicos com as baixas precipitação (menor que 27 mm) do período em que as amostras foram coletadas.

Os níveis elevados de atividade estrogênica, observados para as amostras coletadas na ETE Municipal-período seco, podem estar relacionados ao tipo de composto presentes nos efluentes urbanos. Alguns estudos já mostraram que o hormônio sintético da classe etinilestradiol (EE2) é mais resistente à biodegradação que o hormônio natural estradiol (E2), por isso são mais estáveis, mesmo após tratamento por processo de lodo ativado (PANTER et al., 1999; ARIS et al., 2014). A remoção de substâncias estrogênicas em ETE é um procedimento complexo, dependente de vários fatores, como tipo e idade do lodo, tempo de retenção hidráulica, taxa orgânica do efluente a ser tratado, condições ambientais (luz solar, temperatura, pH) e condições operacionais da estação de tratamento (CLARA et al., 2005).

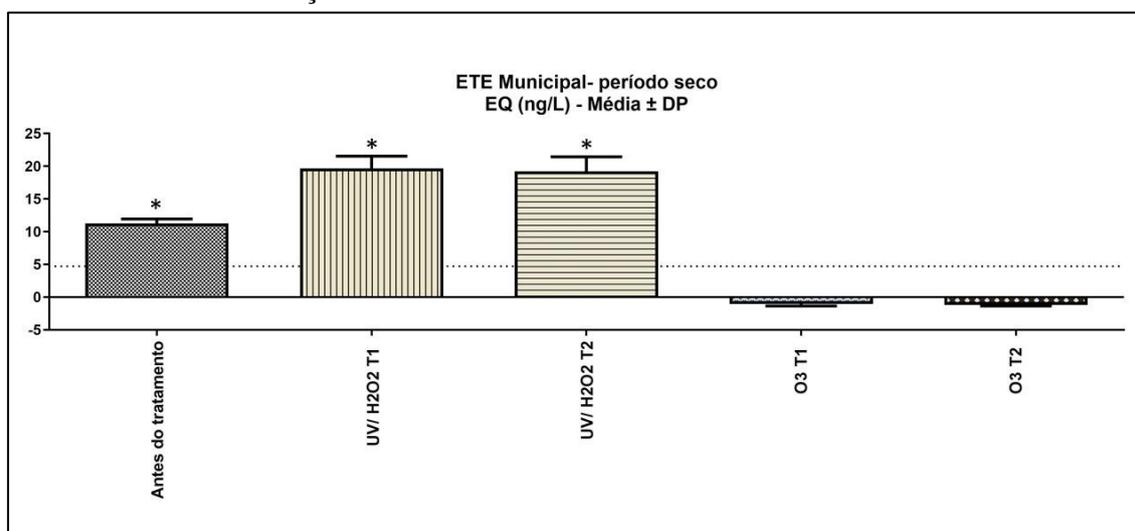
Com relação aos tratamentos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ETE Municipal-período seco), os resultados obtidos na presente pesquisa, mostraram que a concentração de hormônio equivalente foi maior em T1 e T2 do que na amostra do efluente, antes do tratamento. Tal resposta pode estar relacionada à uma somatória de efeitos decorrentes das substâncias estrogênicas originalmente presentes no efluente secundário e da oxidação incompleta de contaminante pela aplicação do tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que levou ao aparecimento de mais compostos com atividades estrogênicas.

Beretsou et al. (2020) estudaram parâmetros químicos e ecotoxicológicos de microcontaminantes, durante a aplicação do processo oxidativo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em águas residuais urbanas. Os autores perceberam que é necessária uma alta fluência da radiação UV para a degradação completa desses contaminantes nas águas residuais, já que a presença de inúmeros interferentes nessa matriz pode retardar a degradação dos compostos, tanto por fotólise quanto por ataque do radical hidroxila. Estudos mostraram

que a presença de contaminantes industriais em efluentes municipais, como carbonatos, nitratos e contaminantes orgânicos prejudicaram o processo de desinfecção do efluente pela capacidade de eliminação do HO•, o que levou a necessidade de aumentar a energia e o tempo de tratamento, para melhorar a desinfecção das amostras (MALVESTITI; DANTAS, 2018; 2019). Frente ao exposto, é possível inferir que para a eliminação da atividade estrogênica das águas residuais estudadas (ETE Municipal-período seco), seria necessário um maior tempo de reação ou até mesmo uma maior fluência da radiação UV. Já, para o tratamento de ozonização, o tempo e as doses estudadas parecem terem sido adequados para a degradação dos compostos presentes nas amostras, pois não foram observadas atividade estrogênica nas mesmas, após esse tratamento.

O risco ambiental dos alteradores endócrinos pode ser subestimado, quando não são avaliados os produtos da transformação dos compostos inicialmente presentes em uma amostra, já que os metabólitos também podem apresentar atividades endócrinas, as vezes, maiores que os próprios compostos originais (ASHFAQ et al., 2018). Além disso, os ensaios biológicos podem detectar níveis de atividades estrogênicas, mesmo em concentrações muito baixas, as quais não são detectadas por análises químicas (BRIENZA et al., 2016). Tais fatos ressaltam a importância de estudos como este, que possibilitam identificar o efeito estrogênico total da matriz, incluindo tanto os contaminantes originais como possíveis compostos, resultantes da oxidação incompleta dos mesmos.

**Figura 2:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L), para os extratos das amostras da ETE Municipal período seco. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.



Para as amostras da ETE Unicamp, tanto as coletadas no período seco quanto no chuvoso, os resultados indicaram que o efluente desta ETE é bastante constante e não sofreu influência da sazonalidade. Em ambas as coletas, as amostragens realizadas antes do tratamento com POAs apresentaram maior potencial estrogênico, o que sugere uma ineficiência do tratamento utilizado pela ETE Unicamp na eliminação da atividade estrogênica das águas residuais. A remoção dos alteradores endócrinos é maior em tratamentos com lodo ativado, sendo observada uma persistência desses compostos em processos anaeróbios (IFELEBUEGU, 2011). Tal fato justificaria os resultados obtidos para essas amostras (extrato antes do tratamento – períodos seco e chuvoso), já que a ETE Unicamp emprega o tratamento do tipo RAFA, cujo tratamento biológico se dá em condições anaeróbias.

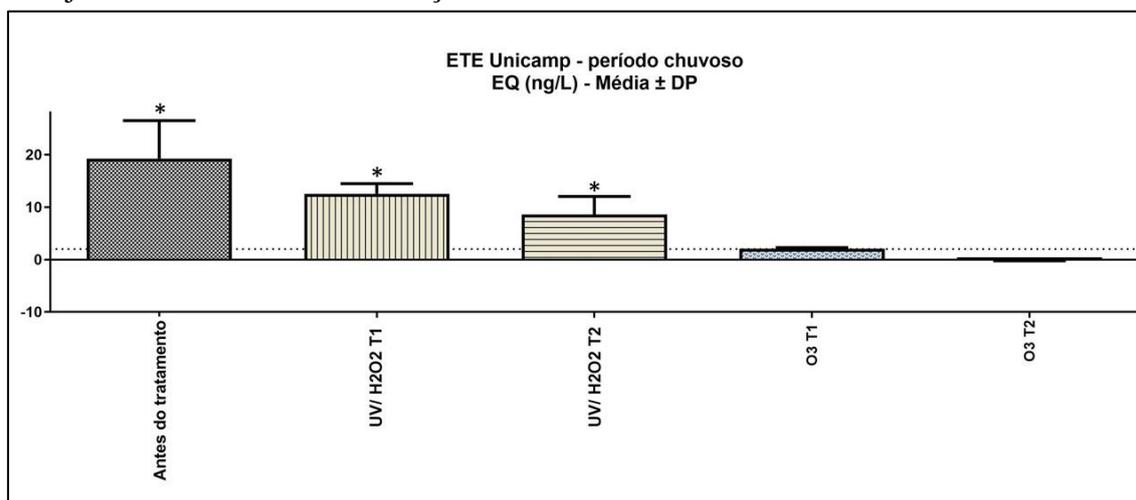
Segundo Adeel et al. (2017), o tratamento inadequado de esgotos, especificamente em relação à remoção de alguns hormônios estrogênicos, é responsável pelos níveis elevados dessas substâncias nas águas dos rios brasileiros. Nossos resultados também registraram atividades estrogênicas significativas, para ambos os efluentes estudados, o que reforça a necessidade de se desenvolver e propor tecnologias mais adequadas para o tratamento de águas residuais e, desse modo, evitar a deterioração dos corpos hídricos.

Já para as amostras submetidas aos POAs da ETE Unicamp, foi observada uma diminuição do efeito estrogênico, em comparação aos efluentes coletados antes desse tratamento. Contudo, um efeito estatisticamente significativo foi observado para as amostras submetidas ao tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mesmo após 40 min de exposição. Desse modo, nas condições empregadas nesse estudo, o uso de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como tratamento terciário não foi suficiente para eliminar a estrogenicidade do efluente secundário da ETE Unicamp. Entretanto, diferentemente do aumento da atividade estrogênica observado para a ETE Municipal, este POA na ETE Unicamp, provavelmente, não induziu a formação de subprodutos estrogênicos.

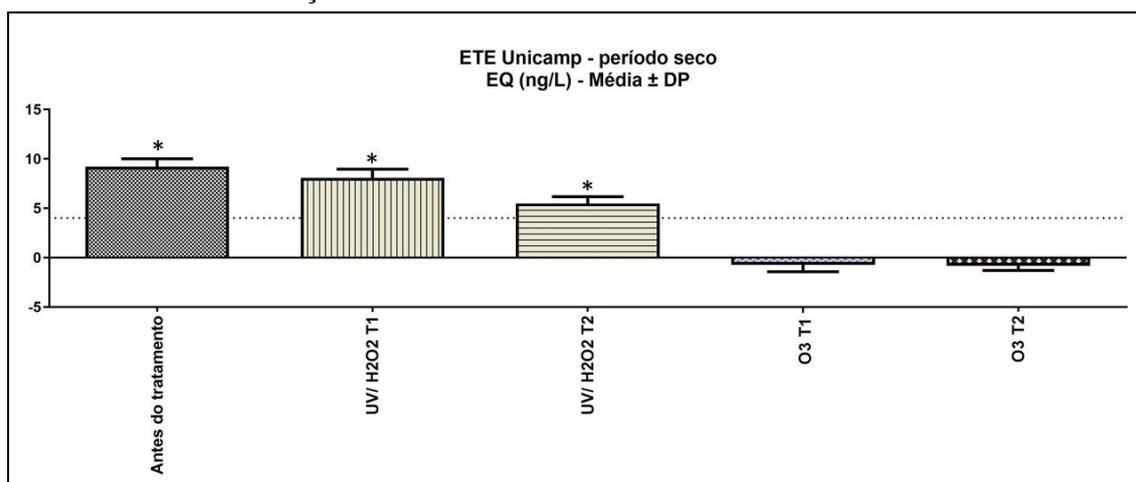
Chen et al. (2006) investigaram a ação de processos oxidativos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na degradação de substâncias estrogênicas, em soluções aquosas. Os autores relataram que este tratamento reduziu, significativamente, a atividade estrogênica da amostra estudada. Assim, a diferença entre a efetividade da ação do UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evidenciada pelos autores e a observada no presente estudo, deve estar relacionada à composição da matriz estudada, já que os efluentes apresentaram características físico-químicas diferentes, o que pode ter interferido no sucesso do tratamento. Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de haver uma maior concentração desses contaminantes nos efluentes deste estudo. Desse

modo, possivelmente, um maior tempo de reação fosse necessário para a redução da atividade observada nesse tratamento.

**Figura 3:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L), para os extratos das amostras da ETE Unicamp período chuvoso. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.



**Figura 4:** Atividade estrogênica apresentada por concentração de hormônio equivalente (ng/L) para os extratos das amostras da ETE Unicamp período chuvoso. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste.



A maioria das substâncias que apresentam resultados positivos para estrogenicidade possuem uma função orgânica fenólica em sua estrutura (NISHIRAHA et al., 2000). Além de hormônios naturais e sintéticos, como já comentado, muitos produtos farmacêuticos e industriais, como bisfenol A, parabenos, nonilfenol, octfenol e

ftalatos, também apresentam ação estrogênica (NISHIHARA et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2009; BADIA-FABREGAT et al., 2012). Os subprodutos de compostos estrogênicos, gerados durante a aplicação de POA, também podem apresentar atividade estrogênica, como, por exemplo, o 4-hidroxiestrona; 4-hidroxestradiol; 10 $\epsilon$ -17 $\beta$ dihidroxi-1,4-estradieno-3-um; 17 $\alpha$ -etinil-1,4-estradieno-10 $\alpha$ ; 17 $\beta$ -diol-3-ona; 17 $\alpha$ -etinil-1,4-estradieno-10 $\beta$ ; 17 $\beta$ -diol-3-ona (CHEN et al., 2012; LIEHR; RICCI, 1996; PEREIRA et al., 2011). A atividade estrogênica observada para os extratos dos efluentes antes e após o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser devido à presença de alguma dessas substâncias no efluente secundário, bem como a presença de outros compostos que podem ter sido gerados, durante o processo oxidativo.

Ashfaq et al. (2018) monitoraram diferentes substâncias com atividades endócrinas (estrona, estradiol, estriol, etinilestradiol, triclosan, triclorocarbono, e outras) e os produtos de transformação das mesmas (hidroxestrona, hidroxestradiol, metil triclosano, carbanilida e outras) em águas residuais na China. Os autores observaram que muitos desses produtos foram removidos durante o processo de tratamento convencional, exceto o triclosan, triclorocarbono e alguns de seus produtos de transformação (metil-triclosano, carbanilida e diclorocarbanilida), liberados ou gerados durante o processo de tratamento. Os compostos estrogênicos, mesmo em concentrações muito baixas (menor que 10 ng/L), podem causar feminilização, defeitos congênitos e anormalidades físicas em peixes (LIU et al, 2009; BELHAJ et al, 2015; HOM-DIAZ et al, 2015). Portanto, é essencial o desenvolvimento de tecnologias que sejam capazes de reduzir e até mesmo degradar esses contaminantes.

Em contrapartida, os tratamentos com ozônio, para qualquer tempo de reação empregado, foram eficientes em degradar as substâncias com atividades estrogênicas de ambos efluentes estudados, tanto de um efluente gerado por tratamento biológico anaeróbico (ETE Unicamp) quanto por tratamento com lodo ativado (ETE Municipal-período seco). Com isso, podemos inferir que o tratamento de ozonização proposto foi eficiente na remoção dos compostos estrogênicos dos efluentes secundários estudados.

Alguns estudos já mostraram que o tratamento de efluentes sanitários com ozônio pode diminuir ou até remover o potencial estrogênico desses efluentes (CAO et al, 2009; ESCHER; BRAMAZ, 2009; GIEBNER et al., 2016; HUBER et al., 2004; STALTER et al., 2010; STALTER et al., 2011), pela transformação oxidativa das substâncias estrogenicamente ativas, em substâncias sem atividades estrogênicas (HUBER et al., 2004). Além disso, o processo de ozonização pode ser menos tóxico, quando comparado

a outros processos POA, sendo mais eficiente na remoção de produtos farmacêuticos e seus intermediários de oxidação (ANDREOZZI et al., 2004; ANDREOZZI et al., 2006).

### 3.2 Ensaio com *Salmonella*

O ensaio com *Salmonella*/microsoma foi realizado com as linhagens TA98 e TA100, linhagens estas amplamente utilizadas em estudos de mutagênese ambiental (SILVA JÚNIOR, VARGAS, 2009). Pela ampla diversidade de mutágenos possíveis de serem encontrados nas águas residuais, nem sempre todos eles são identificados pelas análises químicas. Assim, dependendo da cepa utilizada e da capacidade metabólica empregada, o ensaio com *Salmonella* permite a identificação de várias classes de substâncias com efeito mutagênico (UMBUZEIRO; MACHALA; WEISS, 2011; UMBUZEIRO; HERINGA; ZEIGER, 2016). Além disso, por sua alta sensibilidade, o ensaio de Kado (uma variação do teste de Ames), é recomendado para a avaliação de amostras ambientais, principalmente, quando se testa misturas complexas e substâncias presentes em pequenas concentrações (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O efluente secundário da ETE Unicamp coletado antes do tratamento com POAs, não apresentou efeito mutagênico, para nenhuma das linhagens testadas. Foram observadas respostas significativas para a potência mutagênica de ambas as linhagens (TA98 e TA100), na presença de fração metabolizadora, para a amostra UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da ETE Unicamp – período seco (Tabela 2). Esses resultados sugerem que essas amostras continham agentes pró-mutágenos capazes de induzir efeito significativo, somente após serem metabolizados. Dessa forma, inferimos que os compostos presentes no efluente, quando tratados com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podem produzir substâncias com potencial mutagênico, capazes de induzir tanto mutações do tipo *frameshift*, como substituição por pares de base, quando metabolizados, não apresentando uma ação específica. Contudo, como o IM calculado encontrava-se abaixo de 2 (valor mínimo considerado para uma amostra potencialmente mutagênica), inferimos que a concentração de contaminantes com efeito mutagênico não foi tão expressiva. Assim, é possível inferir que o extrato referente ao efluente da ETE Unicamp-período seco, após tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentou indícios de mutagenicidade, não podendo, contudo, ser considerada como mutagênico. Mesmo assim, esse resultado serve de alerta, quanto ao uso dessa tecnologia no tratamento de águas residuais e pela possibilidade da formação de compostos intermediários com ação mutagênica.

**Tabela 2:** Resultados obtidos pela contagem dos revertentes por placa, para as linhagens TA 98 e TA 100, com e sem sistemas de metabolização S9, submetidas aos extratos das amostras coletadas na ETE Unicamp, antes e após aplicação de processos oxidativos avançados, por 40 minutos.

		ETE Unicamp							
Amostras	[ ] Extrato μL/μL	Média de revertentes/placa ± DP							
		TA 98				TA 100			
		- S9	IM	+ S9	IM	- S9	IM	+ S9	IM
CN		27,4 ± 7,1	1,0	31,8 ± 6,7	1,0	124,0 ± 8,3	1,00	125,0 ± 12,4	1,0
Antes do tratamento	<b>0,5</b>	23,7 ± 3,5	0,86	28,0 ± 7,0	0,88	101,6 ± 6,8	0,82	84,3 ± 17,9	0,67
	<b>1</b>	27,7 ± 11,6	1,01	28,3 ± 3,1	0,89	111,0 ± 13,0	0,90	103,7 ± 6,0	0,83
	<b>2</b>	30,7 ± 5,0	1,12	29,0 ± 10,8	0,91	116,0 ± 8,0	0,94	96,3 ± 8,5	0,77
	<b>4</b>	29,7 ± 3,2	1,08	32,3 ± 3,2	1,02	114,7 ± 14,6	0,93	107,3 ± 10,9	0,86
	<b>8</b>	30,0 ± 1,0	1,09	35,7 ± 1,2	1,12	106,7 ± 14,6	0,86	106,3 ± 5,5	0,85
	<b>16</b>	30,3 ± 7,1	1,11	28,7 ± 4,0	0,90	104,0 ± 9,5	0,84	118,0 ± 14,5	0,94
Potência mutagênica <sup>a</sup>		264 ± 0,3		20 ± 0,2		–		841 ± 0,5	
UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2	<b>0,5</b>	33,3 ± 7,9	1,20	41,3 ± 8,4	1,30	111,7 ± 5,8	0,90	100,0 ± 3,6	0,80
	<b>1</b>	36,3 ± 2,1	1,33	26,7 ± 1,2	0,84	99,0 ± 6,2	0,80	109,7 ± 21,8	0,88
	<b>2</b>	32,0 ± 6,1	1,17	34,0 ± 3,0	1,07	105,0 ± 6,6	0,85	101,0 ± 4,2	0,81
	<b>4</b>	30,3 ± 2,3	1,11	29,7 ± 4,5	0,93	99,3 ± 9,1	0,80	103,3 ± 0,6	0,83
	<b>8</b>	35,0 ± 9,2	1,28	39,3 ± 2,9	1,24	105,0 ± 21,0	0,85	119,5 ± 2,1	0,96
	<b>16</b>	33,3 ± 4,9	1,22	41,0 ± 9,5	1,29	103,5 ± 0,7	0,83	136,5 ± 0,7	1,09
Potência mutagênica		240 ± 0,3		<b>609 ± 0,3*</b>		–		<b>1316 ± 0,6*</b>	
O <sub>3</sub> T2	<b>0,5</b>	24,3 ± 7,4	0,89	36,7 ± 4,5	1,15	114,7 ± 17,1	0,93	107,3 ± 7,4	0,86
	<b>1</b>	33,3 ± 4,5	1,22	34,0 ± 1,7	1,07	101,0 ± 5,29	0,81	90,3 ± 16,9	0,72
	<b>2</b>	34,7 ± 3,5	1,27	28,7 ± 9,0	0,90	118,0 ± 9,5	0,95	106,7 ± 3,5	0,85
	<b>4</b>	34,3 ± 6,5	1,25	21,7 ± 6,5	0,68	128,7 ± 1,15	1,04	108,3 ± 15,4	0,87
	<b>8</b>	29,7 ± 4,7	1,08	18,3 ± 3,8	0,58	126,3 ± 1,1	1,02	101,3 ± 9,07	0,81

<b>16</b>	30,0 ± 2,6	1,09	29,0 ± 5,6	0,91	110,7 ± 2,5	0,89	103,3±31,5	0,83
Potência mutagênica	134 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	-

IM: índice de mutagenicidade, n° de revertentes da amostra/ n° revertentes do controle

<sup>a</sup> Potencial de mutagenicidade, calculado por meio da regressão linear da curva dose-resposta, sendo esta sempre proporcional à potência. Expressa quantitativamente em número de revertentes/mL de extrato.

\* Amostra com resposta indicativa de mutagenicidade (resultado significativo para ANOVA e dose-resposta)

Heringa et al. (2011) estudaram os efeitos biológicos da aplicação de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tratamento de água. Para a realização do estudo, os autores concentraram as amostras pelo processo de extração em fase sólida com cartucho OASIS® HLB. Os resultados do estudo mostraram um aumento significativo no número de mutações para a cepa TA98 (com e sem S9), após a aplicação desse tratamento, havendo uma diminuição do potencial mutagênico para essas amostras, somente após tratamento com carvão ativado. Esses resultados indicando que o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode gerar subprodutos com características mutagênicas para essa linhagem de *Salmonella*, o que corrobora o observado no presente estudo. Jia et al. (2015) observaram resultados significativos para as cepas TA 98, com e sem ativação metabólica, para amostras de águas residuais tratadas com UV, com uma maior toxicidade dos compostos, após a ativação metabólica. Contudo, de acordo com esses mesmos autores a mutagenicidade observada estaria relacionada, prioritariamente, com a radiação UV, e não diretamente com a aplicação do peróxido de hidrogênio, uma vez que a radiação ultravioleta pode levar a formação de subprodutos com características mutagênicas nas amostras.

Em nosso estudo, foram observados resultados significativos apenas para os testes com ativação metabólica, após o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A aplicação deste POA induziu a formação de pró-mutágenos que, só após ativação metabólica pelas enzimas do citocromo P450 (contidas na mistura S-9 do fígado), causaram danos ao material genético das cepas estudadas. O homogenato de fígado (S9) contém enzimas de fase I ativas, mas nenhuma de fase II (que catalisa principalmente as reações de desintoxicação) (MISIK et al., 2020; KIRKLAND et al., 2005). Alguns produtos químicos cancerígenos, como aminas aromáticas ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são biologicamente inativos, a menos que sejam metabolizados em formas ativas (MORTEKMANS; ZEIGER, 2000). Dessa forma, é provável que alguns dos produtos químicos que causaram os efeitos observados sejam ativados por enzimas da fase I.

Aminas aromáticas já foram encontradas em águas e podem ser resultado da decomposição de corantes azo (OHE et al., 2004). As aminas aromáticas heterocíclicas, que já foram detectadas em águas residuais urbanas (KATAOKA et al., 2000) causaram danos, após metabolização. As nitrosaminas, um importante mutágeno ambiental (GUSHGARI; HALDEN, 2018), podem ser formadas após utilização de POA (HOLLENDER et al., 2009). Esses compostos são ativados, metabolicamente, via enzimas hepáticas (HE; FENG, 2015). Dessa forma, alguns desses compostos podem ser os responsáveis por algum nível de resposta observada no presente estudo.

Os tratamentos com ozônio, realizados no presente estudo, não aumentaram significativamente a mutagenicidade dos efluentes tratados, para as cepas estudadas. Esses dados são corroborados pelas citações de Misik et al (2020), que não observaram efeitos das amostras de águas residuais ozonizadas sobre as cepas TA 98 e TA 100. No entanto, quando esses autores testaram as amostras em outra linhagem (YG7108), foi detectado um aumento das atividades mutagênicas, após o processo de ozonização. Outros estudos que também utilizaram a cepa de *S. typhimurium* YG7108 verificaram um aumento da mutagenicidade, após a ozonização de águas residuais, o qual só foi diminuído pelo tratamento de filtração, realizado com carvão ativado (GIEBNER et al., 2016; TERNES et al., 2017). Tais experimentos demonstraram que a aplicação de POA pode levar à geração de subprodutos com características mutagênicas, e que as respostas estão diretamente relacionadas às características das águas residuais, bem como ao tipo de cepa utilizada.

Apesar de não terem sido realizadas análises químicas dos efluentes no presente estudo, os ensaios biológicos aplicados responderam, de modo satisfatório, fornecendo informações suficientes para a compreensão e avaliação da eficácia dos tratamentos por POAs. Além disso, por serem menos onerosos que as análises químicas, eles podem ser utilizados como ferramentas de varredura, direcionando a caracterização química, apenas para amostras bioativas (FERNANDEZ et al., 2009). Adicionalmente, as análises químicas detectam os poluentes de maneira limitada e, nem sempre, estão de acordo com os efeitos tóxicos observados em águas residuais (TANG et al., 2014). A combinação de diferentes bioensaios também é extremamente necessária para uma avaliação completa das respostas biológicas e dos potenciais produtos gerados durante a aplicação de POA em águas residuais.

#### 4. Conclusão

Este estudo demonstrou que as águas residuais aqui estudadas, resultantes de processos de tratamentos secundários convencionais distintos, apresentaram efeitos estrogênicos significativos, o que evidencia um potencial poluidor desses efluentes, principalmente quanto à introdução de alteradores endócrinos nos corpos hídricos.

O tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foi eficiente para remoção da atividade estrogênica do efluente secundário, além de promover o aparecimento de subprodutos no efluente tratado com lodo ativado, resultando em um efeito estrogênico ainda mais pronunciado. Esse tratamento também levou à formação de pró-mutágenos, o que sugere sua ineficácia na eliminação de atividades biológicas, do tipo estrogênicas e mutagênicas, das águas residuais.

Já, o tratamento com ozônio foi capaz de eliminar a atividade estrogênica das amostras, além de não contribuir para a formação de compostos intermediários, com ação estrogênica e mutagênica, indicando que esse POA pode ser uma alternativa promissora para a descontaminação de efluentes secundários, com esses tipos de atividade biológica.

Os bioensaios utilizados foram sensíveis para avaliação das substâncias presentes nas amostras de efluentes de águas residuais, antes e após tratamento oxidativo, ajudando a inferir quais tipos de substâncias poderiam estar presentes nas amostras. No entanto, também foi possível inferir a necessidade de realização de mais estudos, para avaliar a eficiência de processos de tratamentos por POAs na remoção de micropoluentes, bem como a utilização de outras linhagens de leveduras e bactérias, que forneçam informações complementares aos ensaios aqui realizados e permitam, desta forma, uma avaliação mais abrangente sobre os contaminantes presentes nos efluentes, e modo de ação desses compostos sobre os organismos.

#### 5. Referências

COELHO, L. H. G. et al. Estrogenic Hormones in São Paulo Waters (Brazil) and Their Relationship with Environmental Variables and *Sinapis alba* Phytotoxicity. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 4, p. 1-19, 2020.

BARCELO, D.; PETROVIC, M. Emerging contaminants in wastewaters: sources and occurrence: emerging contaminants from industrial and municipal waste—occurrence, analysis and effects. *Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 5. Part S1: Water Pollution. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-36, 2008.

- RANI, C. N.; KARTHIKEYAN, S. Endocrine disrupting compounds in water and wastewater and their treatment options—a review. **International Journal of Environmental Technology Management**, v. 19, p. 392–431, 2016.
- ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. **Environmental International**, v. 99, p. 107–119, 2017.
- AWWA Research Foundation (AwwaRF). Featured Topics, EDC, PhACs, PCPs, 2005.
- RIZZO, L. et al. Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 986-1008, 2019.
- ZHANG, Y.; ZHOU, J. L. Occurrence and removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater. **Chemosphere**, v. 73, n. 5, p. 848-853, 2008.
- SANTOS, A. S. P.; et al. Capacidade de reuso de efluentes de estações de tratamento de esgoto na bacia hidrográfica do paraíba do sul. **Semioses**, v. 12, n. 3, p. 16-33, 2018.
- RAGAZZO, P. et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. **Water research**, v. 116, p. 44-52, 2017.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Water reuse: potential for expanding the nation's water supply through reuse of municipal wastewater. National Academies Press, The National Academies Press, Washington, DC (2012), p. 262, 2012.
- GERRITY, D. et al. Potable reuse treatment trains throughout the world. **J. Water Supply Res. Technol. - Aqua**, v. 62, p. 321-338, 2013.
- BERETSOU, V. G. et al. A chemical, microbiological and (eco) toxicological scheme to understand the efficiency of UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation on antibiotic-related microcontaminants in treated urban wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 744, p. 140835, 2020.
- MALVESTITI, J.A.; DANTAS, R F. Disinfection of secondary effluents by O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Influence of carbonate, nitrate, industrial contaminants and regrowth. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, n. 1, p. 560-567, 2018.
- MALVESTITI J.A.,et al. Optimization of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone wastewater treatment by the experimental design methodology, *Environmental Technology*, v. 40, n.15, p. 1910-1922, DOI: 10.1080/09593330.2018.1432698, 2019.
- QUADRA, G. R. et al. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1200-1218, 2017.
- JIA, A. et al. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. **Water research**, v. 80, p. 1-11, 2015.
- JRC. Something from Nothing? Ensuring the Safety of Chemical Mixtures. Doi: 10.2760/618648, 2018.
- KORTENKAMP, A.; FAUST, M. Regulate to reduce chemical mixture risk. **Science**, v. 361, n. 6399, p. 224-226, 2018.

NEALE, P. A. et al. Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture-toxicity modeling. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 24, p. 14614-14624, 2015.

PEDRAZZANI, R. et al. Opinion paper about organic trace pollutants in wastewater: Toxicity assessment in a European perspective. **Science of the total environment**, v. 651, p. 3202-3221, 2019.

ESCHER, B.; LEUSCH, F. Bioanalytical tools in water quality assessment. IWA publishing, 2011.

ZHANG, Y.; ZHOU, J. L. Occurrence and removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater. **Chemosphere**, v. 73, n. 5, p. 848-853, 2008.

NAKADA, N. et al. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water research**, v. 40, n. 17, p. 3297-3303, 2006.

KUMAR, V. et al. The arrival and discharge of conjugated estrogens from a range of different sewage treatment plants in the UK. **Chemosphere**, v. 82, n. 8, p. 1124-1128, 2011.

SCHULZ, M. et al. Transformation of the X-ray contrast medium iopromide in soil and biological wastewater treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 19, p. 7207-7217, 2008.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R. Treatment of micropollutants in water and wastewater. IWA Publishing, 2010.

WHITE, P.A., CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res.*, v.567, p.227-345, 2004.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C.C.; MARIN-MORALES, M. A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. **Chemosphere**, v. 163, p. 508-515, 2016.

GARCÍA-REYERO, N. et al. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 6, p. 1152-1158, 2001.

BAZIN, I. et al. Profiling the biological effects of wastewater samples via bioluminescent bacterial biosensors combined with estrogenic assays. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 33-41, 2017.

WAGNER, M.; OEHLMANN, J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 3, p. 278-286, 2009.

VÖLKER, J. et al. Advancing biological wastewater treatment: extended anaerobic conditions enhance the removal of endocrine and dioxin-like activities. **Environmental science & technology**, v. 50, n. 19, p. 10606-10615, 2016.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research Letters**, v. 121, n. 1, p. 25-32, 1983.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 97, n. 4, p. 267-281, 1982.

MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 11-19, 2002.

ANDRADE, S. J. et al. Mutagenic activity of airborne particulate matter (PM10) in a sugarcane farming area (Araraquara city, southeast Brazil). **Environmental research**, v. 111, n. 4, p. 545-550, 2011.

AURIOL, Muriel et al. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 525-539, 2006.

KIRK, L. A. et al. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment Works. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 21, n. 5, p. 972-979, 2002.

SERVOS, M. R. et al. Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 336, n. 1-3, p. 155-170, 2005.

KESSABI, K., et al. Possible chemical causes of skeletal deformities in natural populations of *Aphanius fasciatus* collected from the Tunisian coast. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2683-2689, 2013

KESSABI, K. et al. Evaluation of environmental impact on natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* by quantitative RNA biomarkers. **Marine environmental research**, v. 70, n. 3-4, p. 327-333, 2010.

ZHOU, H. et al. Behaviour of selected endocrine-disrupting chemicals in three sewage treatment plants of Beijing, China. **Environmental monitoring and assessment**, v. 161, n. 1, p. 107-121, 2010.

ANDERSEN, H. et al. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 18, p. 4021-4026, 2003.

NAKADA, N. et al. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water research**, v. 40, n. 17, p. 3297-3303, 2006.

SÖNMEZ, M. S. et al. Ultra trace determination of selected endocrine disrupter compounds in sludge samples using HPLC-ESI-MS. MS after ultrasound-aided sequential extraction, *Clean*, v. 9, p. 980-985, 2012.

GARCÍA-REYERO, N. et al. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 6, p. 1152-1158, 2001.

AURIOL, M. et al. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 525-539, 2006.

LING, Teck-Yee et al. Seasonal changes and spatial variation in water quality of a large young tropical reservoir and its downstream river. **Journal of Chemistry**, v. 2017, 2017.

BELHAJ, Dalel et al. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 154-160, 2015.

YU, Y.; WU, L.; CHANG, A. C. Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 310-316, 2013.

PESSOA, G. P. et al. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288-295, 2014.

PANTER, G. H. et al. Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. **Chemosphere**, v. 38, n. 15, p. 3579-3596, 1999.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment international**, v. 69, p. 104-119, 2014.

CLARA, M. et al. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. **Water research**, v. 39, n. 19, p. 4797-4807, 2005.

ASHFAQ, M. et al. Monitoring and mass balance analysis of endocrine disrupting compounds and their transformation products in an anaerobic-anoxic-oxic wastewater treatment system in Xiamen, China. **Chemosphere**, v. 204, p. 170-177, 2018.

BRIENZA, M. et al. Use of solar advanced oxidation processes for wastewater treatment: Follow-up on degradation products, acute toxicity, genotoxicity and estrogenicity. **Chemosphere**, v. 148, p. 473-480, 2016.

IFELEBUEGU, A.O. The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 245-254, 2011.

ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. **Environment international**, v. 99, p. 107-119, 2017.

CHEN, Jian Lin et al. Catalytic oxidative degradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by FeIII-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Estrogenicities of the products of partial, and extensive oxidation. **Water research**, v. 46, n. 19, p. 6309-6318, 2012.

NISHIHARA, T. et al. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of health science*, v. 46, n. 4, p. 282-298, 2000.

FERNANDEZ, Marc P. et al. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 3, p. 957-968, 2009.

BADIA-FABREGAT, M. et al. Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. **J Environ Manage**, v.104, p.114-120, 2012.

LIEHR, J. G.; RICCI, M.J. 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 8, p. 3294-3296, 1996.

PEREIRA, R. O. et al. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 789-799, 2011.

LIU, Ze-hua; KANJO, Y.; MIZUTANI, S.. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment—physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. **Science of the total environment**, v. 407, n. 2, p. 731-748, 2009.

BELHAJ, Dallel et al. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 154-160, 2015.

HOM-DIAZ, A. et al. Microalgae cultivation on wastewater digestate:  $\beta$ -estradiol and  $17\alpha$ -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. **Journal of environmental management**, v. 155, p. 106-113, 2015.

CAO, Nan et al. Evaluation of wastewater reclamation technologies based on in vitro and in vivo bioassays. **Science of the total environment**, v. 407, n. 5, p. 1588-1597, 2009.

ESCHER, B.I.; BRAMAZ, N.; ORT, C. Monitoring the treatment efficiency of a full scale ozonation on a sewage treatment plant with a mode-of-action based test battery. **Journal of Environmental Monitoring**, v.11, n.10, p. 1836-1846, 2009.

GIEBNER, S. et al. Effectivity of advanced wastewater treatment: reduction of in vitro endocrine activity and mutagenicity but not of in vivo reproductive toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n.5, p. 3965-3976, 2016.

HUBER, M.M.; TERNES, T.A.; VON GUNTEN, U. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of  $17\alpha$ -ethynylestradiol. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n.19, p. 5177-5186, 2004.

STALTER, D.,et al. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. **Water research**, v. 45, n. 3, p. 1015-1024, 2011.

STALTER, D. et al. Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. **Water Research**, v. 44, n.2, p.439-448, 2010.

ANDREOZZI, R. et al. Effects of advanced oxidation processes (AOPs) on the toxicity of a mixture of pharmaceuticals. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 23-28, 2004.

ANDREOZZI, Roberto et al. Lincomycin solar photodegradation, algal toxicity and removal from wastewaters by means of ozonation. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 630-638, 2006.

SILVA JÚNIOR, F.M. R.; VARGAS, V.M. F. Using the Salmonella assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 2, p. 116-123, 2009.

UMBUZEIRO, Gisela; MACHALA, Miroslav; WEISS, Jana. Diagnostic tools for effect-directed analysis of mutagens, AhR agonists, and endocrine disruptors. In: **Effect-directed analysis of complex environmental contamination**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 69-82.

UMBUZEIRO, Gisela De Aragao; HERINGA, Minne; ZEIGER, Errol. In vitro genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. **In vitro Environmental Toxicology-Concepts, Application and Assessment**, p. 59-80, 2016.

HERINGA, M.B.; et al. Formation and removal of genotoxic activity during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-GAC treatment of drinking water. **Water Res.**, v. 45, n.1, p. 366-374, 2011.

JIA, Ai et al. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. **Water research**, v. 80, p. 1-11, 2015.

KIRKLAND, David et al. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 584, n. 1-2, p. 1-256, 2005.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

OHE, Takeshi; WATANABE, Tetsushi; WAKABAYASHI, Keiji. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2-3, p. 109-149, 2004.

KATAOKA, Hiroyuki et al. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the water of the Danube River. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 466, n. 1, p. 27-35, 2000.

GUSHGARI, Adam J.; HALDEN, Rolf U. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. **Chemosphere**, v. 210, p. 1124-1136, 2018.

HOLLENDER, J.et al. Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 20, p. 7862-7869, 2009.

HE, X.; FENG, S. Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers. **Current drug metabolism**, v. 16, n. 10, p. 850-863, 2015.

TERNES, T. A. et al. Integrated evaluation concept to assess the efficacy of advanced wastewater treatment processes for the elimination of micropollutants and pathogens. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 1, p. 308-319, 2017.

FERNANDEZ, M. P. et al. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 3, p. 957-968, 2009.

TANG, Janet YM et al. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water?. **Water research**, v. 60, p. 289-299, 2014.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

---

A presente pesquisa foi capaz de fornecer resultados importantes, quanto aos tratamentos oxidativos avançados de ozonização e de UV combinada ao peróxido de hidrogênio. Dessa forma, podemos concluir que:

- O indicador bacteriano *E. coli* foi sensível a ambos os tratamentos oxidativos, não sendo mais identificado após a aplicação de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e após o maior tempo do tratamento com O<sub>3</sub>. Isso demonstra que, além avaliação da desinfecção de *E. coli* do efluente, há a necessidade de também estimar o poder desinfetante do tratamento para outros microrganismos patogênicos, que possam comprometer a segurança e qualidade de corpos hídricos receptores e a saúde humana;

- Nas condições estudadas, o tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mais eficiente para o processo de desinfecção que o tratamento com ozônio;

- Os microrganismos *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* e *Pseudomonas* foram identificados, mesmo após a aplicação de processo de desinfecção com ozônio;

- O gênero *Bacillus* foi encontrado nas amostras, mesmo após aplicação dos períodos mais longos de aplicação de O<sub>3</sub> e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

- Uma identificação mais detalhada dos possíveis microrganismos patogênicos nas amostras de efluentes tratados por POA pode resultar em um melhor gerenciamento da água, sendo possível avaliar qual o destino e aplicação mais segura para esses efluentes;

- O bioindicador *Lactuca sativa* foi sensível na avaliação das amostras antes e após aplicação dos POA, sendo observado uma inibição do crescimento da raiz, para todas as amostras da ETE Municipal período seco;

- Foram observados efeitos genotóxicos significativos nas células HepG2/C3A, tanto no ensaio do cometa quanto no de MN, para as amostras submetidas a ambos os tratamentos oxidativos. No entanto, o tratamento com O<sub>3</sub> mostrou-se mais seguro, pois, apesar de não diminuir o efeito genotóxico observado inicialmente nos efluentes, este não acarretou um aumento deste potencial, como observado no tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

- Foram observados efeitos estrogênicos para amostras coletadas antes e após aplicação do tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrando que esse tratamento, nas condições empregadas, não foi eficiente para remover essa atividade das amostras. No entanto, o tratamento com O<sub>3</sub> foi eficiente para diminuição da atividade estrogênica a níveis não detectáveis no ensaio com leveduras;

- O tratamento com UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a formação de pró-mutágenos nas amostras, já que foram observados resultados significativos no ensaio de *Salmonella*/microsoma, na presença de S9, para as amostras submetidas a esse tratamento, indicando um potencial mutagênico para esse tipo de POA;

- A O<sub>3</sub> se mostrou mais promissor para ser aplicado como tratamento de efluentes secundários, já que não aumentou a toxicidade das amostras estudadas, quando essa estava presente no efluente inicial, bem como foi capaz de degradar os compostos com atividades estrogênicas. No entanto, seria interessante uma melhor adequação da dosagem e do tempo de aplicação desse POA, para melhorar ainda mais o processo de desinfecção dos efluentes, bem como reduzir efetivamente os potenciais tóxicos das amostras;

- Este estudo mostrou que o tempo de aplicação do POA, bem como o tipo de tratamento secundário utilizado na ETE, pode influenciar na geração dos compostos tóxicos presentes nos efluentes;

- Também foi observado que a sazonalidade pode influenciar diretamente na atividade biológica das amostras;

- Os bioensaios utilizados foram sensíveis para avaliação das substâncias presentes nas amostras de efluentes de águas residuais, antes e após tratamento oxidativo, ajudando a inferir quais tipos de substâncias poderiam estar presentes nestas amostras.

- É essencial a avaliação não apenas do poder de desinfecção dos POA nos efluentes secundários, mas também as possíveis atividades biológicas que esses efluentes tratados possam gerar em diferentes biomarcadores;

- Novos estudos são necessários com aplicação de maiores tempos de tratamento, ou o emprego de um pós tratamento ao POA, como por exemplo filtração em carvão ativado, para avaliação de possíveis melhoras na eliminação dos compostos tóxicos ou se os potenciais tóxicos podem ser diminuídos nas amostras dos efluentes.

## ANEXO 1

Tabela 1: Bioensaios utilizados e os resultados observados em cada ensaio.

Amostras	Bioensaio	Sistema teste	Endpoint	ETE	Resultados observados			
Não concentrada	<i>Lactuca sativa</i> (alface)	<i>Lactuca sativa</i>	Germinação	ETE Unicamp	Todos os tratamentos > 90%			
				ETE Municipal	Todos os tratamentos >90%			
			Crescimento raiz	ETE Unicamp	ICR: todos os tratamentos > 0,8 Média do crescimento semelhantes ao CN			
				ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> ICR: antes do tratamento = 0,6; demais tratamentos > 0,8 Média do crescimento: UV/H2O2 T2 > CN			
			Crescimento hipocótilo	ETE Unicamp	<u>Período seco:</u> 0 < ICR de todos tratamentos > 0,8 Média do crescimento: Todos os tratamentos < CN			
				ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Média do crescimento: Antes do tratamento: O <sub>3</sub> T1; O <sub>3</sub> T2; UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2 > CN			
			Ensaio do Cometa	Cultura de células HepG2/C3A	Porcentagem de DNA na cauda	ETE Unicamp	Nenhum resultado estatisticamente significativo, exceto CP.	
						ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Nenhum resultado estatisticamente significativo, exceto CP. <u>Período seco:</u> Estatisticamente significativo para UV/H2O2 T1 e T2.	
					Momento da Cauda de olive	ETE Unicamp	Nenhum resultado estatisticamente significativo, exceto CP.	
						ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Nenhum resultado estatisticamente significativo, exceto CP. <u>Período seco:</u> Estatisticamente significativo para UV/H2O2 T1 e T2.	
					Ensaio do Micronúcleo	Micronúcleo	ETE Unicamp	Estatisticamente significativo para todos os tratamentos.
							ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Nenhum resultado estatisticamente significativo, exceto CP. <u>Período seco:</u> Estatisticamente significativo para todos os tratamentos.

				ETE Unicamp	Estatisticamente significativo para todos os tratamentos.
			Brotos nucleares	ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Nenhum resultado estatisticamente significativo, exceto CP <u>Período seco:</u> Estatisticamente significativo para UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1 e T2
			Alterações compostas	ETE Unicamp	Nenhum resultado estatisticamente significativo, exceto CP.
				ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Estatisticamente significativo para amostra antes do tratamento. <u>Período seco:</u> Estatisticamente significativo para UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1
			Total das alterações	ETE Unicamp	Estatisticamente significativo para todos os tratamentos.
				ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Estatisticamente significativo para amostras antes do tratamento, O <sub>3</sub> T2 e UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2 <u>Período seco:</u> Estatisticamente significativo para UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1 e T2
	Ensaio de microssuspensão (Teste de Kado)	<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98	ETE Unicamp	Mutagenicidade para a amostra UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2 na presença de S9.
			TA 100	ETE Unicamp	Mutagenicidade para a amostra UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T2 na presença de S9.
Concentrada (Extração em fase sólida)	Ensaio com levedura recombinante - YES	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Estrogenicidade	ETE Unicamp	<u>Período chuvoso:</u> Antes do tratamento, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1 e T2. <u>Período seco:</u> Antes do tratamento, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1 e T2.
				ETE Municipal	<u>Período chuvoso:</u> Não foi observado atividade estrogênica para nenhuma das amostras. <u>Período seco:</u> Antes do tratamento, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> T1 e T2.

Tratamentos realizados: O<sub>3</sub> (tratamento de ozonização); UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tratamento com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio); T1: período de 20 minutos; T2: período de 40 minutos. Estatisticamente significativo quando comparado ao CN, p< 0,05.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 1369/97: Tanques sépticos- Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos – Projeto, construção e operação, 1997.

ACERO, J. L.; VON GUNTEN, Urs. Characterization of oxidation processes: ozonation and the AOP O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal-American Water Works Association**, v. 93, n. 10, p. 90-100, 2001.

ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. **Environmental International**, v. 99, p. 107–119, 2017.

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p.5575–5599, 2016. DOI 10.1099/ijsem.0.001485

ALAM, M.Z.M.; OHGAKI S. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in producing the residual effect of ultraviolet radiation. **Water Environ. Res.**, v. 74, n.3, p. 248–255, 2002.

ALEXANDER, J. et al. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. **Sci. of the Total Environ.**, v. 559, p. 103-112, 2016.

ALKAN U. et al. Efficiency of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process for the disinfection of humic surface waters. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 42, n.4, p. 497-506, 2007. DOI: 10.1080/10934520601188375

ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental microbiology**, v.3, n.1, 1-9, 2001.

AMES, B. N. et al. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973.

AMES, B. N.; HARTMAN, P.E. The histidine operon. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1963. p. 349-356.

AMINHARATI, F. et al. *Citrobacter freundii* foodborne disease outbreaks related to environmental conditions in Yazd Province, Iran. **Iranian journal of public health**, v. 48, n. 6, p. 1099, 2019.

AN, X. L. Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR. **Environ. Int.**, v. 117, p. 146-153, 2018.

ANA (Agência Nacional de Águas). Atlas esgoto: despoluição de bacias hidrográficas. Secretaria

Nacional de Saneamento Ambiental, Brasília, 88p., 2017.

ANA (Agencia Nacional de Águas). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil - Encarte Especial sobre a Crise Hídrica**. 2014. Disponível em <<http://conjuntura.ana.gov.br/docs/crisehidrica.pdf>>. Acesso em: 22 ago 2016.

ANA (Agência Nacional de Águas). Quantidade de água. 2018. Disponível em:<<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/aguas-no-brasil/panorama-das-aguas/quantidade-da-agua>>. Acesso em 17/12/2018.

ANDERSEN, H. et al. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 18, p. 4021-4026, 2003.

ANDRADE, S. J. et al. Mutagenic activity of airborne particulate matter (PM10) in a sugarcane farming area (Araraquara city, southeast Brazil). **Environmental research**, v. 111, n. 4, p. 545-550, 2011.

ANDREOZZI, R. et al. Effects of advanced oxidation processes (AOPs) on the toxicity of a mixture of pharmaceuticals. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 23-28, 2004.

ANDREOZZI, Roberto et al. Lincomycin solar photodegradation, algal toxicity and removal from wastewaters by means of ozonation. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 630-638, 2006.

ANGELAKIS, Andreas N. et al. Water reuse: from ancient to modern times and the future. **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, p. 26, 2018.

ANTONIOU, M. G. et al. Required Ozone Doses for Removing Pharmaceuticals from Wastewater Effluents. **Science of the Total Environment**, v. 42, n. 9, p. 456-457, 2013. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.072.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e identificação de bactérias de importância médica – Módulo 6**. Brasília: ANVISA, 2013.

AQUASTAT. n.d. AQUASTAT website. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). [www.fao.org/nr/water/aquastat/water\\_use/index.stm](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_use/index.stm). (Acessado em 25 de janeiro de 2021).

ARCHELA, E. et al. **Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos**. Londrina, v. 12, n.1, p. 517-525, 2003.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment international**, v. 69, p. 104-119, 2014.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment international**, v. 69, p. 104-119, 2014.

ARISTIZÁBAL-HOYOS, A. M. et al. High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. **J. of Environ. Managem.**, v. 245, p. 37-47, 2019.

ASANO, T. Water from (Waste) water: the dependable water resource. **Water Sci. and Technol.**, v. 45, n.8, p. 23-33, 2002.

ASHFAQ, M. et al. Monitoring and mass balance analysis of endocrine disrupting compounds and their transformation products in an anaerobic-anoxic-oxic wastewater treatment system in Xiamen, China. **Chemosphere**, v. 204, p. 170-177, 2018.

ASSIRATI, D. M. **Desinfecção de Efluentes de ETE com ozônio para uso agrícola**. 171 f. Dissertação (Mestrado em Eng. Civil, na Área de Concentração de Saneamento Ambiental). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

ASTM (American Society for Testing and Materials) E2186-02 (2010). Standard Guide for Determining DNA Single-Strand Damage in Eukaryotic Cells Using the Comet Assay, 2010.

AUERBACH, E. A.; SEYFRIED, E. E.; MCMAHON, K. D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. **Water research**, v. 41, n.5, p.1143-1151, 2007.

AURIOL, M., et al. Y. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 525-539, 2006.

AWWA Research Foundation (AwwaRF). Featured Topics, EDC, PhACs, PCPs, 2005.

BADIA-FABREGAT, M. et al. Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. **J Environ Manage**, v.104, p.114-120, 2012.

BARCELO, D.; PETROVIC, M. Emerging contaminants in wastewaters: sources and occurrence: emerging contaminants from industrial and municipal waste—occurrence, analysis and effects. *Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5. Part S1: Water Pollution*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1–36, 2008.

BARRAUD, O. et al. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n. 7, p. E306-E308, 2013.

BAZIN, I. et al. Profiling the biological effects of wastewater samples via bioluminescent bacterial biosensors combined with estrogenic assays. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 33-41, 2017.

BECERRA-CASTRO, C. et al. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. **Environment international**, v. 75, p. 117-135, 2015.

BELHAJ, Dalel et al. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 154-160, 2015.

BENGTSON NASH, S.M. et al. The combined SPE: ToxY-PAM phytotoxicity assay; application and appraisal of a novel biomonitoring tool for the aquatic environment. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 7, p. 1443-1451, 2005.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol*, v.153, p.S347–S357, 2008.

BERESFORD, N., et al. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 162, p. 22-33, 2000.

BERETSOU, V. G. et al. A chemical, microbiological and (eco) toxicological scheme to understand the efficiency of UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation on antibiotic-related microcontaminants in treated urban wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 744, p. 140835, 2020.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 97, n. 4, p. 267-281, 1982.

BITTON, G. 2005. **Wastewater Microbiology**, 3rd ed. Hoboken, New Jersey: **John Wiley & Sons**.

BLUM et al. Removal of 30 active pharmaceutical ingredients in surface water under long-term artificial UV irradiation. **Chemosphere.**, v. 176, p. 175-182, 2017.

BONASSI, S.; et al. **An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis**, v. 28, p. 625-631, 2007.

BRACK, W. et al. Towards the review of the European Union Water Framework Directive: recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 720-737, 2017.

BRASIL. Decreto-Lei n. 152, de 19 de junho de 1997. Dispõe sobre coleta, tratamento e descarga de águas residuais no ambiente aquático. *Diário da República*, Brasília, n. 139, I-série A, p. 2959, 1997.

BRASIL. MMA (Ministério do meio ambiente). Conselho Nacional de recursos hídricos. Resolução n°54, 28 de Novembro de 2005.

BRASIL. MMA (Ministério do meio ambiente). Conselho Nacional de recursos hídricos. Resolução n°121, 16 de Dezembro de 2010.

BRAUNSTEIN, J.L. et al. Ultraviolet disinfection of filtered activated sludge effluent for reuse applications. **Water Environ. Res.**, v. 68, p. 152–161, 1996.

BRAUNSTEIN, J.L. et al. Ultraviolet disinfection of filtered activated sludge effluent for reuse applications. **Water Environ. Res.**, v. 68, p. 152–161, 1996.

BRACK, Werner et al. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, v. 31, n. 1, p. 1-6, 2019.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação da técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009

BRIENZA, M. et al. Use of solar advanced oxidation processes for wastewater treatment: Follow-up on degradation products, acute toxicity, genotoxicity and estrogenicity. **Chemosphere**, v. 148, p. 473-480, 2016.

BRITO, N. N.; SILVA, V.B. M. Processo oxidativo avançado e sua aplicação ambiental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v.3, n.1, 2011.

BRIX, R.; et al. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. **Enviro Int**, v.36, p.361-367, 2010.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. New Jersey: Madigan, Michael T Martinko, Jhon M Parker, Jack, 9 ed. Biology of Microorganisms, P.H.I. Inc. 2000.

BROOKS, J. P. et al. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 616-622, 2007.

BROSÉUS, Romain et al. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. **Water research**, v. 43, n. 18, p. 4707-4717, 2009.

BRUSICK, D.J. **Principles of Genetic Toxicology**, New York: Plenum Press., 1987

BRZOZOWSKI, A. M; et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 753, 1997.

BUELOW, E. et al. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 7, 2018.

BUREK, P.; et al. 2016. Water Futures and Solution: Fast Track Initiative (Final Report). IIASA Working Paper No. WP-16-006. Laxenburg, Austria, International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA). [pure.iiasa.ac.at/id/eprint/13008/1/WP-16-006.pdf](http://pure.iiasa.ac.at/id/eprint/13008/1/WP-16-006.pdf).

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 115-118, 1950.

CAI, L.; JU, F.; ZHANG, T. Tracking human sewage microbiome in a municipal wastewater treatment plant. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, p. 3317-3326, 2014.

CAI, L.; ZHANG, T. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. **Environmental science & technology**, v. 47, n.

10, p. 5433-5441, 2013.

CAO, Nan et al. Evaluation of wastewater reclamation technologies based on in vitro and in vivo bioassays. **Science of the total environment**, v. 407, n. 5, p. 1588-1597, 2009.

CAPAGNA-FERNANDES, A.F.; MARIN, E.B.; PENHA, T.H.F.L. Application of root growth endpoint in toxicity tests with lettuce. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 27-32, 2016.

CARDOZO, T. R. et al. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutat. Res.**, v. 603, p. 83-96, 2006

CARVALHO, A. R.; OLIVEIRA, M. V. C. **Princípios básicos do saneamento do meio**. 10 ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2010. 400 p.

CASTIGLIONI, S. et al. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. **Environ. Sci. and Technol.**, v. 40, p. 357-363, 2006.

CAVALLINI, G. S. et al. Use of peracetic acid in sanitary sewage disinfection: a review. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, n.1, p. 27-40, 2012.

CESAR, R.G. et al. Biodisponibilidade de mercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuario do Instituto de Geociências**, v. 31, n. 2, p. 33-41, 2008.

CETESB. Apêndice D: significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade. São Paulo, CETESB, 2015. 48 p. Disponível em: <<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

CHAI, Q. et al. A comparison of genotoxicity change in reclaimed wastewater from different disinfection processes. **Chemosphere**, v. 191, p. 335-341, 2018.

CHANG Y. T. et al. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. **Front. Microbiol.** v. 6, p. 893, 2015.

CHARLES, J. et al. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 7, p. 2057-2064, 2011.

CHEN, Jian Lin et al. Catalytic oxidative degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by FeIII-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Estrogenicities of the products of partial, and extensive oxidation. **Water research**, v. 46, n. 19, p. 6309-6318, 2012.

CHIELLINI, C., et al. Ozonation effects for excess sludge reduction on bacterial communities composition in a full-scale activated sludge plant for domestic wastewater treatment. **Environ. Technol.**, v. 35, p. 1462-1469, 2014.

CHOUDRI, B. S. et al. Wastewater treatment, reuse, and disposal-associated effects on environment and health. **Water Environment Research**, v. 92, n. 10, p. 1595-1602, 2020.

CHUANG, Yi-H. ; et al. Comparing the UV/monochloramine and UV/free chlorine advanced oxidation processes (AOPs) to the UV/hydrogen peroxide AOP under scenarios relevant to potable reuse. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 23, p. 13859-13868, 2017.

CHUNG, C. J. et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. **Surface and coatings technology**, v. 203, n.8, p. 1081-1085, 2009.

CIIAGRO. 2020. Climatological data. Available in: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QTmedPeriodo.asp>. Access: jun/2020.

CLARA, M. et al. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. **Water research**, v. 39, n. 19, p. 4797-4807, 2005.

COELHO, L. H. G. et al. Estrogenic Hormones in São Paulo Waters (Brazil) and Their Relationship with Environmental Variables and *Sinapis alba* Phytotoxicity. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 4, p. 1-19, 2020.

COLLINS, A.; et al. **The comet assay: topical issues. Mutagenesis**, v. 23, p.143-151, 2008.

COORS, A. et al. Prospective environmental risk assessment of mixtures in wastewater treatment plant effluents—theoretical considerations and experimental verification. **Water research**, v. 140, p. 56-66, 2018.

COSTA, H.; DANIEL. L. **Estudo do comportamento do ozônio na desinfecção de águas residuárias domiciliares**. Relatório Final PROSAB Edital 3 – Tema 2 – Desinfecção de Efluentes Sanitários, remoção de Patógenos e Substâncias Nocivas – Vitória, ES, dez. 2002.

COSTA, J. B. **Avaliação ecotoxicológica de efluente de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta**. 2007. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

DANIEL, L. A. (Coordenador) **Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável**. p. 155. Projeto PROSAB, Rio de Janeiro, 2001,

DANTAS, R.F. et al. Assessment of Cationic Surfactants Mineralization by Ozonation and Photo-Fenton Process. **Water Environ. Res.**, v. 81, n. 2, p. 201-205, 2009.

DASH, A. K. Impact of domestic waste water on seed germination and physiological parameters of rice and wheat. **Int J Res Rev Appl Sci**, v. 12, n. 2, p. 280-286, 2012.

DENTINI, P. et al. Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis in a Brazilian reference center. **Med Microbiol Immunol**, v. 206, p. 447–461, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0521->

DICKIN, S. K. et al. A Review of health risks and pathways for exposure to wastewater use in agriculture. **Environmental health perspectives**, v. 124, n.7, p. 900-909, 2016.

DIZER, H. et al. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. **Chemosphere**, v. 46, n. 2, p. 225-233, 2002.

DOLEJSKA, M. et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. **J. of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n.12, p. 2784-2790, 2011.

DOMÈNECH, X.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I. **Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes**. In *Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea*; BLESÁ, M. Ed. CYTED (Ibero- American Science and Technology for Sustainable Development): La Plata, Argentina, 2001, pp. 3-26.

DUDZIAK, M.; BURDZIK, E. Oxidation of bisphenol A from simulated and real urban wastewater effluents by UV, O<sub>3</sub> and UV/O<sub>3</sub>. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, p.1075-1083, 2014.

DURUSOY, M.; KAMBUR, S. The application of the umu-test system for screening mutagenicity of surface water. *Turk. J. Biochem.* V. 28, p. 3–7, 2003.

DWA (2019) DWA-Topics - Non-Potable Water Reuse - Development, Technologies and International Framework for Agricultural, Urban and Industrial Uses. In: DWA Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft (eds) *Abwasser und Abfall e. V.*, June 2019

DZIEWECZYNSKI, T. L.; HEBERT, O. L. The effects of short-term exposure to an endocrine disrupter on behavioral consistency in male juvenile and adult Siamese fighting fish. **Archives of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 64, n. 2, p. 316–326, 2013.

ELHARIRY H M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1266-1274, 2011.

EPRS. European Parliamentary Research Service. 2020. Water reuse: setting minimum requirements. EPRS BRI(2018)625171\_EN, 2018.

ERGENE, S. et al. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, New York, v.16, p.385-391, 2007.

ERGENE, S.; et al. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, New York, v.16, p.385-391, 2007.

ESCHER, B. I. et al. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 3, p. 1940-1956, 2013.

ESCHER, B. I. et al. Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. **Science of the Total Environment**, v. 628, p. 748-765, 2018.

ESCHER, B. I. et al. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 5, p. 612-621, 2008.

ESCHER, B. I., et al. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environmental science & technology*, v. 48, n. 3, p. 1940-1956, 2013.

ESCHER, B.; LEUSCH, F. Bioanalytical tools in water quality assessment. IWA publishing, 2011.

ESCHER, B.I. et al. Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.24, n.3, p. 750-758, 2005.

ESCHER, B.I.; BRAMAZ, N.; ORT, C. Monitoring the treatment efficiency of a full scale ozonation on a sewage treatment plant with a mode-of-action based test battery. **Journal of Environmental Monitoring**, v.11, n.10, p. 1836-1846, 2009.

ESCHER, B.I. et al. 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 Environmental Monitoring**, v.10, p. 622-631, 2008.

ETCHEPARE, R., et al. Application of flocculation-flotation followed by ozonation in vehicle wash wastewater treatment/disinfection and water reclamation. **Desalination and Water Treatment**, v. 56, p. 1728-1736, 2014.

European Commission (2018) Proposal for a Regulation of the European Parliament and the council on minimum requirements for water reuse. 337 final 2018/0169 (COD) Brussels, 28 May 2018.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013. Water Scarcity: An Action Framework for Agriculture and Food Security. FAO Water Reports No. 38. Rome, FAO. [www.fao.org/3/a-i3015e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i3015e.pdf).

FARIÑAS, M. C., & MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Multiresistant Gram-negative bacterial infections: Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 31(6), p. 402-409, 2013.

FATTA-KASSINOS, D. et al. The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. **Sci Total Environ**, v.409, p. 3555-3563, 2011.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.2, n.5, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleous technique. **Mutation Research**. v. 455, p. 81- 95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. **Mutat. Res.** v.161, p. 193-198, 1986.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environ. Safety**, v.72, p. 1680-1686, 2009.

FERNANDEZ, M. P. et al. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 3, p. 957-968, 2009.

FERREIRA DA SILVA, M. et al. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban waste water treatment plant. **FEMS Microbiol Ecol**, v.60, p. 166-176, 2007.

FIGUEIRA, V. et al. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. **Water research**, v. 45, n.17, p. 5599-5611, 2011.

FORCELLA, C. et al. Qnr B9 in Association with TEM-116 Extended-Spectrum Beta-Lactamase in *Citrobacter freundii* Isolated from Sewage Effluent: First Report from Italy. **Journal of Chemotherapy**, v. 22, n.4, p. 243-245, 2010.

FORSTER, D. H.; DASCHNER, F. D. *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. **EUR. J. Clin. Microbiol. Infectar. Dis.**, v. 17, p. 73-77, 1998.

FOWLER, P. et al. Reduction of misleading (“false”) positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 742, n. 1-2, p. 11-25, 2012.

GALLERT, C.; FUND, K.; WINTER, J. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n.1, p.106-112, 2005.

GALVIN, S. et al. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n.14, p.4772-4779, 2010.

GARCÍA-REYERO, N. et al. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 6, p. 1152-1158, 2001.

GEHR, R.; WAGNER, M.; VEERASUBRAMANIAN, P. Payment, Disinfection efficiency of peracetic acid: UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. **Water Res.**, v. 37, p. 4573–4586, 2003.

GELDREICH, E.E. Aspectos microbiológicos dos esgotos e dos seus processos de tratamento. In: Secretaria dos Serviços e Obras Públicas. Desinfecção das águas. São Paulo, CETESB. 1974. cap. 10, p. 115-34.

GERRITY, D. et al. Potable reuse treatment trains throughout the world. **J. Water Supply Res. Technol. - Aqua**, v. 62, p. 321-338, 2013.

GIEBNER, S. et al. Effectivity of advanced wastewater treatment: reduction of in vitro endocrine activity and mutagenicity but not of in vivo reproductive toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n.5, p. 3965-3976, 2016.

GIGER, W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 37–44, 2009.

GIUDICE, B.D.; YOUNG, T.M. Mobilization of endocrine-disrupting chemicals and estrogenic activity in simulated rainfall runoff from land-applied biosolids. **Environ. Toxicol. Chem.** v.30, p.2220–2228, 2011.

GOETHEM, F.V. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mut. Res.**, v. 392, p.31-43, 1997.

GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. A review of imperative Technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. **Advances in Environ. Res.**, v. 8, p. 553-597, 2004.

GOMES, A. I.; VILAR, V. J.; BOAVENTURA, R. A. Synthetic and natural waters disinfection using natural solar radiation in a pilot plant with CPCs. **Catalysis today**, v. 144, p. 55-61, 2009.

GONÇALVES, R. F. **Desinfecção de efluentes sanitários**. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, 2003, 438 p.: il. Projeto PROSAB.

GONÇALVES, R.F.; JORDÃO, E. P.; SOBRINHO, P.A. Introdução. In: GONÇALVES, R. F. (Coord). Projeto PROSAB: Desinfecção de efluentes sanitários. Rio de Janeiro: ABES, RiMA, 2003. p.1-26.

GONZALES, S.; PEÑA, A.; ROSARIO-ORTIZ, F. L. Examining the Role of Effluent Organic Matter Components on the Decomposition of Ozone and Formation of Hydroxyl Radicals in Wastewater. **Ozone: Sci. and Engineering**, v. 34, p. 42-48, 2012.

GOONETILLEKE, A.; VITHANAGE, M. Water Resources Management: Innovation and Challenges in a Changing World. **Water**, v. 9, n. 4, p. 281, 2017.

GOPALAN, H. N. B. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 99-102, 1999.

GRANUN P. E.; LUND T. Bacillus cereus and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223-228, 1997.

GRISOLIA, C.K. **A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C, and various pesticides.** **Mutat. Res.**, v.518, p. 145-150, 2002.

GUARDABASSI, L.; LO FO WONG, D.M.A.; DALSGAARD, A. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. **Water Res**, v. 36, p. 1955-1964, 2002.

GURLER, J. B.; BEUCHAT, L. R. Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and ecometric techniques. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 7661–7669, 2005.

GUSHGARI, Adam J.; HALDEN, Rolf U. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. **Chemosphere**, v. 210, p. 1124-1136, 2018.

GUZZELLA, L.; FERETTI, D.; MONARCA, S. Advanced oxidation and adsorption technologies for organic micropollutant removal from lake water used as drinking-water supply. **Water Research**, v. 36, n. 17, p. 4307-4318, 2002.

HAM, J. H.; MELANSON, R.A.; RUSH, M. C. Burkholderia glumae: next major pathogen of rice? **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 4, p. 329-339, 2011.

HAMER, B. et al. Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 466, n. 2, p. 161-171, 2000.

HAMMES, F. et al. Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. **Water Res.** v. 40, p. 2275-2286, 2006.

HARA, R.V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic

potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State–Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 2017.

HARNISZ, M.; KORZENIEWSKA, E. The prevalence of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. in the municipal wastewater system and their dissemination in the environment. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 377-383, 2018.

HARTMANN, A.; et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, Londres, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HE, X.; FENG, S. Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers. **Current drug metabolism**, v. 16, n. 10, p. 850-863, 2015.

HELMECKE, M.; FRIES, E.; SCHULTE, C. Regulating water reuse for agricultural irrigation: risks related to organic micro-contaminants. *Environmental Sciences Europe*, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2020.

HERINGA, M.B.; et al. Formation and removal of genotoxic activity during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-GAC treatment of drinking water. **Water Res.**, v. 45, n.1, p. 366-374, 2011.

HEUSER, V.; et al. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biol. Int.**, v.32, p. 1223-1229, 2008.

HIMRI, I. et al. Place of the genotoxicity in the ecotoxicology domain. **SMETox Journal**, v. 1, n. 1, p. 10-17, 2018.

HOLLENDER, J. et al. Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 20, p. 7862-7869, 2009.

HOM-DIAZ, A. et al. Microalgae cultivation on wastewater digestate:  $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol degradation and transformation products identification. **Journal of environmental management**, v. 155, p. 106-113, 2015.

HONG, P. Y. et al. Reusing treated wastewater: consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes. **Water**, v. 10, n. 3, p. 244, 2018.

HUBER, M.M.; TERNES, T.A.; VON GUNTEN, U. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 alpha-ethinylestradiol. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n.19, p. 5177-5186, 2004.

HUBER, M.M. et al. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 4290-4299, 2005.

HUMBLE, J. L.; et al. Characterization of genes transcriptionally upregulated in the liver of sand goby (*Pomatoschistus minutus*) by 17 $\alpha$ -ethinylestradiol: Identification of distinct vitellogenin and zona radiata protein transcripts. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2722–2729, 2013.

IAKOVIDES, I. C. et al. Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant *Escherichia coli* and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. **Water research**, v. 159, p. 333-347, 2019.

IFELEBUEGU, A.O. The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 245-254, 2011.

IGERE, B. E.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Wastewater treatment plants and release: The vase of Odin for emerging bacterial contaminants, resistance and determinant of environmental wellness. **Emerging Contaminants**, v. 6, p. 212-224, 2020.

ISO, 1995. Soil quality—determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence of higher plants. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.

ISO, 2018. 19040-1: Water Quality -- Determination of the Estrogenic Potential of Water and Waste Water -- Part 1: Yeast Estrogen Screen (*Saccharomyces cerevisiae*). Geneva, Switzerland (2018)

JENSSEN, D.; RAMEL, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. **Mutat. Res.**, v. 75, p. 191–202, 1980.

JEREMIC, S.; JAKIC-DIMIC, D.; VELJOVIC, L. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. **Acta Vet.**, v. 53, p. 399-410, 2003.

JERÔNIMO, C.H. Uso de técnicas combinadas para o tratamento de efluentes têxteis: separação físico-química e fotodegradação. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* (e-ISSN: 2236-1170), v.8, n. 8, p. 1626-1638, 2012.

JESUS, R. W. P.; et al. **Niveis, processos e sistema de tratamento de esgotos**. In: congresso interdisciplinar – responsabilidade, ciência e ética, 2017.

JIA, A. et al. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. **Water research**, v. 80, p. 1-11, 2015.

JIANG, X. et al. Genetic characterization of a novel sequence type of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* strain recovered from wastewater treatment plant. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2775, 2019.

JIMÉNEZ, B., DRECHSEL, P., KONÉ, D., BAHRI, A., RASCHID-SALLY, L., AND QADIR, M. 2010. Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: An overview. In: P. Drechsel, C.A. Scott, L. Raschid-Sally, M. Redwood and A. Bahri (eds.), *Wastewater Irrigation and Health: Assessing and Mitigating Risks in Low-Income Countries*. Earthscan-International Development Research Centre (IDRC)-International Water Management Institute (IWMI), London, UK, 3–27, 2010.

JIN, D. et al. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. **Scientific reports**, v.8, n.1, p. 1-9, 2018.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 5 ed. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária – ABES Rio de Janeiro, 904p, 2009.

JOSS, A. et al. **Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment**. **Water Research**, v.39, n.14, p. 3139-3152, 2005.

JRC. Something from Nothing? Ensuring the Safety of Chemical Mixtures. Doi: 10.2760/618648, 2018.

JU, F. et al. Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years. **Environ Microbiol Rep**, v.6, p. 80-89, 2014.

JU, F. et al. Wastewater treatment plant resistomes are shaped by bacterial composition, genetic exchange, and upregulated expression in the effluent microbiomes. **The ISME journal**, v. 13, p. 346-360, 2019.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research Letters**, v. 121, n. 1, p. 25-32, 1983.

KASPRZYK-HORDERN B.; DINSDALE R.M.; GUWY, A.J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Res**, v.43, p.363–80, 2009.

KATAOKA, Hiroyuki et al. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the water of the Danube River. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 466, n. 1, p. 27-35, 2000.

KESSABI, K. et al. Evaluation of environmental impact on natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* by quantitative RNA biomarkers. **Marine environmental research**, v. 70, n. 3-4, p. 327-333, 2010.

KESSABI, K., et al. Possible chemical causes of skeletal deformities in natural populations of *Aphanius fasciatus* collected from the Tunisian coast. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2683-2689, 2013

KIRK, L. A. et al. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment Works. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 21, n. 5, p. 972-979, 2002.

KIRKLAND, David et al. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 584, n. 1-2, p. 1-256, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutat. Res.**, v.540, p. 153-163, 2003.

KITTINGER, C. et al. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the river Danube. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 586, 2016.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 315-328, 2004.

KÖRNER, Wolfgang et al. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 10, p. 2142-2151, 2001.

KORTENKAMP, A.; FAUST, M. Regulate to reduce chemical mixture risk. **Science**, v. 361, n. 6399, p. 224-226, 2018.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, v.455, p. 155-166, 2000.

KSIBI, M. Chemical oxidation with hydrogen peroxide for domestic wastewater treatment. **Chem. Eng. J.**, v. 119, p. 161–165, 2006.

KUMAR, V. et al. The arrival and discharge of conjugated estrogens from a range of different sewage treatment plants in the UK. **Chemosphere**, v. 82, n. 8, p. 1124-1128, 2011.

KUMARAVEL, T.S.; et al. Comet assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.

LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. **Medicine**, v. 80, p. 113–122, 2001.

LAJMANOVICH, R.C. et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutat. Res. Gen. Tox. Environ. Mut.** v. 769, p. 7-12, 2014.

LANGLAIS, B., RECKHOW, D.A., BRINK, D.R. Ozone in Water Treatment: Application and Engineering. **Lewis Publishers**, p. 569, 1991.

LAZAROVA V, B. et al. Role of water reuse for enhancing integrated water management in Europe and Mediterranean countries, **Water Science and Technology**, v. 43, p. 25-33, 2001.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 43–64, 2003.

- LEE, Y.; ESCHER, B.I.; VON GUNTEN, U. Efficient removal of estrogenic activity during oxidative treatment of waters containing steroid estrogens. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n.17, p. 6333-6339, 2008.
- LEME, D. M. et al. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199, p. 343– 349, 2012.
- LEME, D.M.; et al. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicol. and Environ. Saf.**, v.74, p.2148-2155, 2011.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Res.**, v.682, p.71–81, 2009.
- LEVINE, A. D.; ASANO, T. Peer reviewed: recovering sustainable water from wastewater. **Environ. Sci. and Technol.**, v. 38, n. 11, p. 201A-2008A, 2004.
- LIBERTI L. et al. Comparison of advanced disinfecting methods for municipal wastewater reuse in agriculture. **Water Sci Technol**, v.42, p. 215–220, 2000. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0316>
- LICCIARDELLO, F. et al. Wastewater tertiary treatment options to match reuse standards in agriculture. **Agricultural water management**, v. 210, p. 232-242, 2018.
- LIEHR, J. G.; RICCI, M.J. 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 8, p. 3294-3296, 1996.
- LIM, M.H. **FATE OF WASTEWATER-DERIVED CONTAMINANTS IN SURFACE WATERS: DISSERTATION. UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY: 2008.**
- LINDHOLM-LEHTO, P.C. et al. Widespread occurrence and seasonal variation of pharmaceuticals in surface waters and municipal wastewater treatment plants in central Finland. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 23, p. 7985–7997, 2016.
- LING, Teck-Yee et al. Seasonal changes and spatial variation in water quality of a large young tropical reservoir and its downstream river. **Journal of Chemistry**, v. 2017, 2017.
- LIU, J.; et al. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicol. in Vitro**, v.26, p.841–8, 2012.
- LIU, Ze-hua; KANJO, Y.; MIZUTANI, S.. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment—physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. **Science of the total environment**, v. 407, n. 2, p. 731-748, 2009.
- LOEB, B.L. et al. Worldwide ozone capacity for treatment of drinking water and wastewater: a review. **Ozone Sci. Eng.**, v. 34, 1, p. 64–77, 2012.
- LOOS, R.; et al. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river Waters. **Environ. Pollut.**, v. 157, p. 561-568, 2009.

LOVEL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, Londres, v. 23, n.3, p. 171-182, 2008.

LUBELLO C.; CARETTI C.; GORI R. Comparison between PAA/UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV disinfection for wastewater reuse. *Water Supply*, v.2, n.1, p. 205–212, 2002. doi: <https://doi.org/10.2166/ws.2002.0025>.

LÜDDEKE, F. et al. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. **Water research**, v. 69, p. 243-251, 2015.

LUNA, C. M.; ARUJ, P. K. Nosocomial acinetobacter pneumonia. **Respirology**, v. 12, n. 6, p. 787-791, 2007.

LUO, Y., et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment.. **Science of the total environment**, v. 473–474, p. 619-641, 2014.

MA, T.-H.; GRANT, W. F.; DE SERRES, F. J. The genotoxicity monitoring of air, water and soil-A preliminary report of the International Programme on Plant Bioassays (IPPB). **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 379, n. S1, p. S99-S99, 1997.

MACEDO, L. C. et al. **Remediação de águas residuais por Fotocatálise Heterogênea**: estudo dos parâmetros experimentais aplicados a fotocatalise eletroquímica. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 27, n. 1, p. 11-21, 2006.

MACOVA, M., et al. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water research*, v. 44, n. 2, p. 477-492, 2010.

MAGDEBURG, A.; STALTER, D.; OEHLMANN, J. Whole effluent toxicity assessment at a wastewater treatment plant upgraded with a fullscale post-ozonation using aquatic key species. **Chemosphere**, v. 88,p.1008–1014, 2012.

MALVESTITI J.A.,et al. Optimization of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone wastewater treatment by the experimental design methodology, **Environmental Technology**, v. 40, n.15, p. 1910-1922, DOI: 10.1080/09593330.2018.1432698, 2019.

MALVESTITI, J.A.; DANTAS, R F. Disinfection of secondary effluents by O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Influence of carbonate, nitrate, industrial contaminants and regrowth. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, n. 1, p. 560-567, 2018.

MANAIA, C. M. et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. **Environ. Int.**, v. 115, p. 312-324, 2018.

- MANZANO, B.C. et al. Evaluation of the genotoxicity of Waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, p. 1399–1407, 2015.
- MARA, D.; HORAN, N. J. (Ed.). Handbook of water and wastewater microbiology. Elsevier, 2003.
- MARIA, I. C.; KOCSSI, M. A.; DECHEN, S. C. F. Agregação do solo em área que recebeu lodo de esgoto. **Solos e Nutrição de plantas**, Bragantia, v. 66, p. 291-298, 2007.
- MARTI, E.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J. L. Prevalence of Antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. 4, p. 1-15, 2018.
- MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear receptor signaling*, v. 4, n. 1, p. nrs. 04016, 2006.
- MAZZEO, D. E. C.; et al. Detoxification of sewage sludge by natural attenuation and implications for its use as a fertilizer on agricultural soils. **Science of The Total Environment**, v. 572, p. 978-985, 2016
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C.C.; MARIN-MORALES, M. A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. **Chemosphere**, v. 163, p. 508-515, 2016.
- MAZZEO, D.E.C.; LEVY,C.E.; ANGELIS,D.F.;MARIN-MORALES,M.A. BTEX biodegradation by bactéria from effluents of petroleum refinery. **Sci. of the Total Environ**, n.408, p. 4334-4340, 2010.
- MELO, S. A. S.; et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Quim. Nova**, v. 32, n.1, p. 188- 197, 2009
- MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 201, p. 71–115, 2009.
- MENESES, M.; PASQUALINO, J. C.; CASTELLS, F. Environmental assessment of urban wastewater reuse: Treatment alternatives and applications. **Chemosphere**, v. 81, n. 2, p. 266-272, 2010.
- MEYBECK, Michel. Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 358, n. 1440, p. 1935-1955, 2003.

MIAO, X.S. et al. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. **Environ. Sci. Technol.** v. 38, p.3533–3541, 2004.

MICHAEL, I. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. **Water research**, v. 47, n.3, p.957-995, 2013.

MICHAEL-KORDATOU, I.; et al. Review - Dissolved effluent organic matter: Characteristics and potential implications in wastewater treatment and reuse applications. **Water Research**, v. 77, p. 213-248, 2015.

MIKLOS, D. B., et al. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process stability and pilot-scale validation for trace organic chemical removal from wastewater treatment plant effluents. **Water Res.**, v. 136, p. 169-179, 2018.

MILLER, C. A. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast - Activation of transcription by indole compounds. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n.52, p. 32824–32829, 1997.

MILLER, G. W. Integrated concepts in water reuse: managing global water needs. *Desalination*, v. 187, p. 65–75, 2006.

MIŠÍK, M. et al. Genotoxic activities of wastewater after ozonation and activated carbon filtration: Different effects in liver-derived cells and bacterial indicators. **Water Research**, v. 186, p. 116328, 2020.

MIŠÍK, M. et al. Use of human derived liver cells for the detection of genotoxins in comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 845, p. 402995, 2019.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Água. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/agua>>. Acessado em: 23/12/2016)

MONARCA, S.; et al. The influence of diferente disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Res.**, v. 34, n.17, p. 4261-4269, 2000.

MORAES, D.S.L. **Avaliacao dos potenciais toxicos, citotoxicos e genotoxicos de aguas ambientais de Corumba-MS em raizes de *Allium cepa***. 2000. 158 f. Tese (Mestrado em Genetica e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2000.

MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 11-19, 2002.

MOREIRA, R.; SOUSA, J.P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewagesludge and derived composts. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p.8382–8389, 2008.

MORRIS, L. et al. Municipal wastewater effluent licensing: A global perspective and recommendations for best practice. **Science. of The Total Environ.**, v.580, p. 1327-1339, 2017.

MORTELMANS, K. A perspective on the development of the Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 841, p. 14-16, 2019.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

MOTTA, E. J. et al. Combined anaerobic/aerobic secondary municipal wastewater treatment: pilot-plant demonstration of the UASB/aerobic solids contact system. **Journal of environmental engineering**, v. 133, n. 4, p. 397-403, 2007.

MOTULSKY, H.; BROWN, R. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BCM Bioinformatics**, Londres, v. 7, p. 123-143, 2006.

MOURA, A. C.; ASSUMPÇÃO, R. A. B.; BISCHOFF, J. Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 17-22, 2009.

MURK, A.J; et al. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. **Environ. Toxicol. Chem.** v.21, p.16–23, 2002.

NAKADA, N. et al. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water research**, v. 40, n. 17, p. 3297-3303, 2006.

NASCIMENTO, T. et al. **International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters.** **Sci. Total Environ.**, v. 598, p. 910-915, 2017.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, p. 399-403, 1991.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Water reuse: potential for expanding the nation's water supply through reuse of municipal wastewater. National Academies Press, The National Academies Press, Washington, DC (2012), p. 262, 2012.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252-275, 2017.

NEALE, P. A. et al. Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture-toxicity modeling. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 24, p. 14614-14624, 2015.

NEVES, L. C. et al. Phytotoxicity indexes and removal of color, COD, phenols and ISA from pulp and paper mill wastewater post-treated by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, p. 110939, 2020.

NISHIHARA, T. et al. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of health science*, v. 46, n. 4, p. 282-298, 2000.

NOGUEIRA, R.F.P.; OLIVEIRA, M.C.; PATERLINI, W.C. Simple and fast spectrophotometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, p. 86-91, 2005.

NUMBERGER, D. et al. Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. **Scientific reports**, v.9, n.1, p.1-14, 2019.

O'NEIL, J. Amr review. The review on antimicrobial resistance, tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations, May 2016. [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf). Acessado em 18 de Setembro de 2020.

OHE, Takeshi; WATANABE, Tetsushi; WAKABAYASHI, Keiji. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2-3, p. 109-149, 2004.

OKOH, A. I. et al. Wastewater treatment plants as a source of microbial pathogens in receiving watersheds. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, 2007.

OLESZCZUK, Patryk. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 496-505, 2008.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2003. Guideline 208. Terrestrial plant test: 208; Seedling emergence and seedling growth test

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2016a. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264885-en>.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2016b. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2017. Diffuse Pollution, Degraded Waters: Emerging Policy Solutions, OECD Studies on Water, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264269064-en>.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD. Guideline for Testing of Chemicals Test. Test Guideline No. 471, Bacterial Reverse Mutation Test, 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD. Guideline for the testing of chemicals proposal for updating guideline 208; terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT- OECD. **In vitro mammalian cell micronucleus test**, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD. Test Guideline 471, OECD Guideline for Testing of Chemicals. Genetic Toxicology: Salmonella typhimurium Reverse Mutation Assay. OECD/Paris, 1983.

OSTLING, O., JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Filadélfia, v. 123, p. 291-298, n. 1, 1984.

OSUNMAKINDE, C. O. et al. Profiling bacterial diversity and potential pathogens in wastewater treatment plants using high-throughput sequencing analysis. **Microorganisms**, v.7, n.11, p. 506, 2019.

OSUOLALE, O.; OKOH, A. Human enteric bacteria and viruses in five wastewater treatment plants in the Eastern Cape, South Africa. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n.5, p. 541-547, 2017.

OTURAN, M. A.; AARON, J. J. Advanced oxidation processes in water/wastewater treatment: principles and applications. A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 23, p. 2577-2641, 2014.

PÁDUA, L.H.R. Reuso de águas residuárias: critérios, análises de periódicos. Monografia de conclusão de curso de Especialização em Engenharia Sanitária e Ambiental. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS, 2011.

PAES, F. A. et al. Diversity of a Chlorine-Resistant Bacillus Population Isolated from a Wastewater Treatment Station. **Water environment research**, v.84, n. 3, p. 274-281, 2012.

PANTER, G. H. et al. Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. **Chemosphere**, v. 38, n. 15, p. 3579-3596, 1999.

PARKINSON, A.; BARRY, M.J.; RODDICK, F.A.; HOBDDAY, M.D. Preliminary toxicity assessment of water after treatment with UV-irradiation and UVC/H2O2. **Water Res.**, v. 35, n.15,

p. 3656-3664, 2001.

PARKINSON, A.; et al. Preliminary toxicity assessment of water after treatment with UV-irradiation and UVC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Water Res.**, v. 35, n.15, p. 3656-3664, 2001.

PAYNE, J. P.; RAJAPAKSE, N. A.; WILKINS, M.; KORTENKAMP, A. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, p. 983-987, 2000.

PAŹDZIOR, E. *Shewanella putrefaciens*: a new opportunistic pathogen of freshwater fish. **Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 429-434, 2016.

PEDRAZZANI, R. et al. Opinion paper about organic trace pollutants in wastewater: Toxicity assessment in a European perspective. **Science of the total environment**, v. 651, p. 3202-3221, 2019.

PEDRAZZANI, R. et al. Opinion paper about organic trace pollutants in wastewater: Toxicity assessment in a European perspective. **Science of the total environment**, v. 651, p. 3202-3221, 2019.

PEDROZA, M. M.; et al. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. **Revista Liberato**, v. 17, p. 89-188, 2010.

PEKALA-SAFIŃSKA, A. Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 261-267, 2018.

PENDERS, E.J.M. et al. Genotoxicity testing of samples generated during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of surface water for the production of drinking water using the Ames test in vitro and the Comet assay and the SCE test in vivo. **J. Water Supp. Res. Technol.** , v. 61, n.7, p. 435-445, 2012.

PERA-TITUS, M.P. et al. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. **Applied Catalysis**, v. 47, p.219-256, 2004.

PEREDA, Olatz et al. Impact of wastewater effluent pollution on stream functioning: A whole-ecosystem manipulation experiment. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113719, 2020.

PEREIRA, R. O. et al. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 789-799, 2011.

PESSOA, G. P. et al. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288-295, 2014.

PETALA, M. et al. Influence of ozonation on the in vitro mutagenic and toxic potential of secondary effluents. **Water Research**, v. 42, n. 20, p. 4929-4940, 2008.

PETROVIC, M. et al. 2008. Emerging contaminants in wastewaters: sources and occurrence: emerging contaminants from industrial and municipal waste—occurrence, analysis and effects.

In: BARCELO, D.; PETROVIC, M. (Eds.), Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5. Part S1: Water Pollution. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1–36.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v.15, p. 289-302, 2000.

PIGNATELLO, J.J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. Critical Review. **Environ. Sci. Technol.**, v.36, p.1-84, 2006

PILLON, A.; et al. Binding of Estrogenic Compounds to Recombinant Estrogen Receptor- $\alpha$ : Application to Environmental Analysis. **Environ. Health Perspectives**, n. 3, p. 278-84, 2005.

PIÑA, B.; et al. Recombinant yeast assays and gene expression assays for the analysis of endocrine disruption. Hdb. **Env. Chem.**, v.5J, p.69-113, 2009.

PLAZA, G.; NAŁĘCZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v.59, p.289-296, 2005.

PODSCHUN, R. et al. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **Applied and Environ. Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3325-3327, 2001.

PRASSE, C.; et al. Spoilt for choice: a critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment Technologies. **Water research**, v. 87, p. 237-270, 2015.

PRIAC, A.; BADOT, P.-M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.

PRUDEN, A. et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. **Environmental science & technology**, v. 40, n.23, 7445-7450, 2006.

PUSPITA, P., RODDICK, F., PORTER, N. Efficiency of sequential ozone and UV- based treatments for the treatment of secondary effluent. **Chemical Engineering Journal**, v. 268, p. 337-347, 2015.

QIN, W.; et al. Treatment of berberine hydrochloride pharmaceutical wastewater by O<sub>3</sub>/UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation process. **Environ. Earth Sci.**, v. 73, p.4939-4946, 2015.

QUADRA, G. R. et al. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1200-1218, 2017.

QURESHI, H.; ARSHAD, M.; BIBI, Y. Toxicity assessment and phytochemical analysis of *Broussonetia papyrifera* and *Lantana camara*: Two notorious invasive plant species. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, Rajshahi, v. 5, n. 2, p. 508-517, 2014.

RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. **Water Res.**, v. 43, p. 831- 841. 2009.

RAGAZZO, P. et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. **Water research**, v. 116, p. 44-52, 2017.

RANI, C. N.; KARTHIKEYAN, S. Endocrine disrupting compounds in water and wastewater and their treatment options—a review. **International Journal of Environmental Technology Management**, v. 19, p. 392–431, 2016.

RAZAVI, M. et al. Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. **Microbiome**, v. 5, p. 160, 2017.

REEMTSMA, T. et al. Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: a european perspective. **Environ. Sci. Technol.**, v.40, p. 5451-5458, 2006.

REIFFERSCHIED, G. et al. Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test—results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 649, n. 1-2, p. 15-27, 2008.

REISINGER, K. et al. Validation of the 3D skin comet assay using full thickness skin models: transferability and reproducibility. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdã, v. 827, p. 27-41, 2018.

REUNGOAT, J. et al. Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. **Water Res.**, v. 44, p. 625-637, 2010.

RIBAS, R. et al. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. **J. of Applied Microbiol.**, v.88, n.4, p.704–710, 2000.

RIBEIRO, A. R. et al. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. **Environment international**, v. 75, p. 33-51, 2015.

RIBEIRO, L. F.; LAPOLLI, F. R.. **Avaliação do comportamento da *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* em efluentes domésticos desinfetados com dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>)**. In: Simpósio Ítalo-brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, 6., Vitória, 2002. Anais... Rio de Janeiro: ABES, 2003. 7 p.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (2003). *Mutagênese Ambiental*. Editora da ULBRA, Canoas, RS. 355p.

RIBEIRO, M. C. M. et al. Textile wastewater reuse after additional treatment by Fenton's reagent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 7, p. 6165-6175, 2017.

RINCÓN, A. G.; PULGARIN, C. Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO<sub>2</sub> photo-assisted treatment of mixed *E. coli* and *Bacillus* sp. and bacterial community present in wastewater. **Catalysis today**, v.101, n.3, p. 331-344, 2005.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water res.**, v. 45, n. 15, p. 4311-4340, 2011.

RIZZO, L. et al. Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 986-1008, 2019.

RODRÍGUEZ, E. A. et al. Multidrug resistance and diversity of resistance profiles in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli throughout a wastewater treatment plant in Colombia. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 22, p. 358-366, 2020.

ROULEAU, S.; LESSARD, P., BELLEFLEUR, D. Behaviour of a small wastewater treatment Plant during rain events. **Can. J. Civ. Eng.** 24 (5), p.790-798, 1997.

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J.P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo). Site Sabesp. Disponível em <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=49>>. Acessado em 29/05/2015.

SABESP. Tratamento de esgotos. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=49>>. Acesso em: 16/12/2018.

SAI, Y.; TAO, H. Ecological security of wastewater treatment processes: A review. **Chinese Journal of Applied Ecol.**, v. 24, n.5, p.1468-1478, 2013.

SALA, L.; SERRA, M. Towards sustainability in water recycling. **Water Sci. Technol.**, v. 50, n. 2, p. 1-7, 2004.

SALEEM M, BUKHARI A.A., AL-MALACK M.H. Seasonal Variations in the bacterial population in an activated sludge system. **J. Environ. Eng. Sci.** v. 2, p. 155-162, 2003

SALEEM, M., BUKHARI, A.A., AL-MALACK, M.H. Removal efficiencies of indicator microorganisms in the Al-Khobar wastewater treatment plant. **Environ. Eng. Sci.**, v.17, n.4, p. 227-232, 2000.

SALGOT, M.; FOLCH, M. Wastewater treatment and water reuse. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 2, p. 64-74, 2018

SAMANTA, S.; DEY, P. **Micronucleus and its applications.** **Diagn. Cytopathol.**, v. 40, p. 84-90, 2012.

SANTOS, A. S. P.; et al. Capacidade de reuso de efluentes de estações de tratamento de esgoto na bacia hidrográfica do paraíba do sul. **Semiotes**, v. 12, n. 3, p. 16-33, 2018.

SCHEWE, J., et al. 2014. Multimodel assessment of water scarcity under climate change. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, Vol. 111, No. 9, pp. 3245–3250. doi.org/10.1073/pnas.1222460110.

SCHMIDT, C.K.; BRAUCH, H-J. N, N-dimethylsulfamide as precursor for N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation upon ozonation and its fate during drinking water treatment. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 17, p. 6340-6346, 2008.

SCHUETZ, A. N. Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. In: *Seminars in Diagnostic Pathology*. WB Saunders, p. 187-192, 2019.

SCHUG, T. T. et al. Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. *Molecular Endocrinology*, v. 30, n. 8, p. 833–847, 2016.

SCHULZ, M. et al. Transformation of the X-ray contrast medium iopromide in soil and biological wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 19, p. 7207-7217, 2008.

SCHWARZENBACH, R.P. et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, v. 313, p. 1072-1077, 2006.

SENG, P. et al. Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. *Int J Infect Dis.*, v. 45, p. 65-71, 2016. doi: 10.1016/j.ijid.2016.02.014. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26921549.

SERVOS, M. R. et al. Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, v. 336, n. 1-3, p. 155-170, 2005.

SES/SIMA(2020)

[http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao\\_urbanismo\\_e\\_meio\\_ambiente/legislacao/leg\\_est\\_adual/leg\\_est\\_resolucoes/Resol-cjta-SES-SIMA-01-2020\\_Processo-ssrh-90-2016\\_reuso-de-agua-nao-potavel\\_fins\\_urbano\\_ETE.pdf](http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao_urbanismo_e_meio_ambiente/legislacao/leg_est_adual/leg_est_resolucoes/Resol-cjta-SES-SIMA-01-2020_Processo-ssrh-90-2016_reuso-de-agua-nao-potavel_fins_urbano_ETE.pdf)

SEYFARTH, F.; et al. U. The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Exp Dermatol*, v.17, p.965-971, 2008.

SHAFIQUE, M.; JAWAID, A.; REHMAN, Y. As (V) reduction, As (III) oxidation, and Cr (VI) reduction by multi-metal-resistant *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis*, and *Bacillus cereus* species isolated from wastewater treatment plant. *Geomicrobiology Journal*, v.34, n.8, p. 687-694, 2017.

SHAO, Ying et al. Integrating bioassays, chemical analysis and in silico techniques to identify genotoxicants in surface water. *Science of the Total Environment*, v. 650, p. 3084-3092, 2019.

SHCHEGOLKOVA, N. M. et al. Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. *Front. Microbiol.*, v. 7, 2016.

SHULER, M.L.; KARGI, F. Immobilized cell systems. In: *Bioprocess engineering: basic concepts*. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ, pp 263–275, 2002.

SIEGRIST, R.L. Treatment for Pathogen Reduction. In: *Decentralized Water Reclamation Engineering*. Springer, Cham, 2017, p. 765-823.

SILVA JÚNIOR, F.M. R.; VARGAS, V.M. F. Using the Salmonella assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 2, p. 116-123, 2009.

SILVA, E.; RAJAPAKSE, N.; KORTENKAMP, A. Something from Nothing – Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 1751-1756, 2002.

SILVA, G. H. R. et al. Anaerobic effluent disinfection using ozone: Byproducts formation. **Biores. Technol.**, v. 101, p. 6981–6986, 2010.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 241-245, 2000.

SILVA, K.C.; SANTOS, R. A.; SANTOS, A. S. P. **Estudo sobre a Atual Situação do Reuso de Águas Servidas Tratadas no Brasil e no Mundo**. XVII Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Florianópolis/SC: 2016.

SILVA, P.; et al. Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads-a stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. **Aquatic toxicology**, v. 124-125, p. 1–10, 2012.

SINGH, K. P., MALIK, A., MOHAN, D., SINHA, S., & SINGH, V. K. Chemometric data analysis of pollutants in wastewater: a case study. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, n.1, p. 15-25, 2005.

SINGH, N.P.; et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SMITAL, T.; TERZIC, S.; ZAJA, R.; SENTA, I.; PIVCEVIC, B.; POPOVIC, M.; AHEL, M. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n.4, p. 844-851, 2011.

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico dos serviços de água e esgoto – 2014**. Ministério das Cidades – Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, p.616, Brasília, 2016.

SNYDER, S.A. et al. **Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals**. **Desalination**, v. 202, p. 156-181, 2007.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA. Canadá, Capítulo, v. 4, p. 71-79, 2004.

SOLAIMAN, Z. M.; MURPHY, D. V.; ABBOTT, L. K. Biochars influence seed germination and early growth of seedlings. **Plant and soil**, v. 353, n. 1, p. 273-287, 2012.

SOMMAGGIO, L. R. D.; et al. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere**, v. 199, p. 10-15, 2018.

SÖNMEZ, M. S. et al. Ultra trace determination of selected endocrine disrupter compounds in sludge samples using HPLC-ESI-MS. MS after ultrasound-aided sequential extraction, *Clean*, v. 9, p. 980-985, 2012.

SOUZA, B.S. et al. Photochemical radical scavenging and process performance. **Chem. Eng. J.** v. 237, p. 268–276, 2014.

STALTER, D. et al. Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. **Water Research**, v. 44, n.2, p.439-448, 2010.

STALTER, D., et al. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. **Water research**, v. 45, n. 3, p. 1015-1024, 2011.

STASINAKIS, A.S. et al. Contribution of primary and secondary treatment on the removal of benzothiazoles, benzotriazoles, endocrine disruptors, pharmaceuticals and perfluorinated compounds in a sewage treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 463, p. 1067-1075, 2013.

STATE OF CALIFORNIA. Regulations and Guidelines for Recycled Water. Title 22 California Code of Regulations. Department of Health Services: Sacramento, California, USA. 1978.

SUN, H. Y. et al. Outbreak of a novel disease associated with *Citrobacter freundii* infection in freshwater cultured stingray, *Potamotrygon motoro*. **Aquaculture**, v. 492, p. 35-39, 2018.

TACCONELLI, E. et al. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.** World Health Organization, 2017.

TANG, J. Y.M., et al. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water?. **Water research**, v. 60, p. 289-299, 2014.

TAVARES, M. G. ; et al. Efficiency and toxicity: comparison between the Fenton and electrochemical processes. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 5, p. 1143-1154, 2016.

TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F. L. **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse.** 3th ed. Mc. Graw-Hill, Inc, 1991.

TERNES, T. A. et al. Integrated evaluation concept to assess the efficacy of advanced wastewater treatment processes for the elimination of micropollutants and pathogens. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 1, p. 308-319, 2017.

TIBURTIUS, E. R. L. et al. Degradação de BTXS via processos oxidativos avançados. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 61-64, 2005.

TICE, R. R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. **Environmental mutagenesis**, 1995.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, Wilmington, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TRENBERTH, K. E., et al. 2014. Global warming and changes in drought. **Nature Climate Change**, Vol. 4, pp. 17–22. doi.org/10.1038/nclimate2067.

TURNBULL, P.C.B. (1996). Bacillus. In: Barron's Medical Microbiology (Baron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 978-0-9631172-1-2, 1996.

TYPAS, A. et al. From the *B. megaterium* regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.10, 123, 2011.

UMBUZEIRO, G.A.; HERINGA, M.; ZEIGER, E. In vitro genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. **In vitro Environmental Toxicology-Concepts, Application and Assessment**, p. 59-80, 2016.

UMBUZEIRO, G.; MACHALA, M.; WEISS, J. Diagnostic tools for effect-directed analysis of mutagens, AhR agonists, and endocrine disruptors. In: **Effect-directed analysis of complex environmental contamination**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 69-82.

UNESCO – United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization . UN-WATER: The United Nations World Water Development Report 2020: Water and climate change, Paris, UNESCO, 2020.

UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). The united nations world water development report 2003: Water for people Water for life. In: WWAP (United Nations World Water Assessment Programme), 2003, Barcelona. Disponível em:<<http://www.unesco.org/new/en/loginarea/naturalsciences/environment/water/wwap/wdr/2015-water-for-a-sustainable-world/>>. Acessado em 17/12/2018

UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). 2015. Water for a sustainable world. In: WWDR (The United Nations World Development Report), 2015. Published in 2015 by the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 7, place de Fontenoy, 75352 Paris 07 SP, France.

UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization).2009. The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World. Paris: UNESCO, and London: Earthscan.

UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). World Water Assessment Programme WWAP. 2019. The United Nations World Water Development Report 2019: Leaving No One Behind. Paris, UNESCO

UNESCO -UNWATER, 2006. Water a shared responsibility, The United Nations World Water Development Report 2. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO) 7, Paris, France.

UNESCO, UN-Water, 2020: United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change, Paris, UNESCO.

USEPA (UNITED STATE ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY). Guidelines for water reuse. Washington DC: USEPA, 2004.

USEPA, 1996. Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination/root elongation toxicity test.

USMAN, M.; FAROOQ, M.; HANNA, K. Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. *Science of the Total Environment*, v.745, p. 141053, 2020.

VÄLITALO, P. et al. Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents. **Water research**, v. 88, p. 740-749, 2016.

VAN ACKER, J. et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 293–297, 2001.

VAN DER KOOIJ, D. Assimilable organic carbon as indicator of bacterial regrowth. **J. Am. Water Works Assoc.**, v.84, p.57-65, 1992.

VENITT, S. (Eds.), **Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers**, Oxford. p. 315-339, 1995.

VIDAL, C. B. et al. Polymeric and silica sorbents on endocrine disruptors determination. *Desalination and Water Treatment*, v. 54, n.1, p.156-165, 2015.

VIENO, N. M.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 21, p. 8220-8226, 2005.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R. Treatment of micropollutants in water and wastewater. IWA Publishing, 2010.

VITAL M., et al. Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 19, p. 6477–6484, 2010. doi:10.1128/AEM.00794-10

VÖLKER, J. et al. Advancing biological wastewater treatment: extended anaerobic conditions

enhance the removal of endocrine and dioxin-like activities. **Environmental science & technology**, v. 50, n. 19, p. 10606-10615, 2016.

VON GUNTEN, U. Ozonation of Drinking Water: Part In. Disinfection and By-Product Formation In Presence of Bromide, Iodide or Chlorine. **Water Research**, v.37, p.1469–87, 2003. doi:10.1016/S0043-1354(02)00458-X

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. in Millennium Ecosystem Assessment Vol. 1, Ch. 7, 165–207 (Island Press, 2005).

VRZOC, M.; PETRAS, M.L. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. **Mut. Res.**, v. 381, p. 31-40, 1997.

WAGNER, M.; OEHLMANN, J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 3, p. 278-286, 2009.

WANG, J. et al. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, Amsterdã, v. 144, p. 510-517, 2016.

WANG, Z. H., et al. Composition and structure of microbial communities associated with different domestic sewage outfalls. **Genet. Mol. Res.**, v.13, p. 7542-7552, 2014.

WEF (World Economic Forum). 2019. The Global Risks Report 2019. Fourteenth Edition. Geneva, WEF. [www.weforum.org/reports/the-globalrisks-report-2019](http://www.weforum.org/reports/the-globalrisks-report-2019), 2019

WESTERINK, W. M.A. et al. Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p. 7-21, 2011.

WESTERINK, W.M.A.; et al. The development of RAD51C, cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. **Mutat. Res.**, v.696, p.21-40, 2010.

WHITE, P.A., CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutat. Res.**, v.567, p.227-345, 2004.

WHO – World Health Organization website, 2017. Available in: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1)

WHO (World Health Organization). 2006. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater. Volume 2: Wastewater use in Agriculture. Geneva:WHO.

WHO (World Health Organization). Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater. Volume 2: Wastewater use in Agriculture. Geneva:WHO, 2006.

WHO. Health Guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. World Health Organization, Technical Report Series 778 WHO, Geneva, CH. 1989.

WHO (2006) Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. World Health Organization, Geneva.

WIECZERZAK, M.; NAMIEŚNIK, J.; KUDŁAK, B. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. **Environment international**, v. 94, p. 341-361, 2016.

WRI -World resources institute website. 2020. Domestic Water Use Grew 600% Over the Past 50 Years. <https://www.wri.org/blog/2020/02/growth-domestic-water-use>. Acessado em 26 janeiro de 2021).

WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). 2017. The United Nations World Water Development Report 2017: Wastewater, The Untapped Resource. Paris, UNESCO.

WWAP (World Water Assessment Programme). 2016. The United Nations World Water Development Report 2016. Water and Jobs. Paris, UNESCO. [www.unesco.org/new/en/naturalsciences/environment/water/wwap/wwdr/2016-water-and-jobs/](http://www.unesco.org/new/en/naturalsciences/environment/water/wwap/wwdr/2016-water-and-jobs/).

WWF. 2020. Water Scarcity. Available in: <https://www.worldwildlife.org/threats/water-scarcity>. Access: sept 2020.

XU, P. et al. Wastewater disinfection by ozone: Main parameters for process design. **Water Res.**, v. 36, p.1043–1055, 2002.

YAN, Y. et al. Comparative evaluation of Bruker Biotyper and BD Phoenix systems for identification of bacterial pathogens associated with urinary tract infections. **J. of Clinical Microb.**, v. 49, n.11, p. 3936-3939, 2011.

YANG, Y., PIGNATELLO, J.J., MA, J., MITCH, W.A. Comparison of halide impacts on the efficiency of contaminant degradation by sulfate and hydroxyl radical-based advanced oxidation processes (AOPs). **Environ. Sci. Technol.**, v. 48, n.4, p. 2344- 2351, 2014.

YANG, Y-Y., et al. Micropollutants in groundwater from septic systems: Transformations, transport mechanisms, and human health risk assessment. **Water research**, v. 123, p. 258-267, 2017.

YANUARYSKA, R.D. Comet assay assessment of DNA damage in buccal mucosa cells exposed to X-Rays via panoramic radiography. **Journal of Dentistry Indonesia**, Jakarta, v. 25, n. 1, p. 53-57, 2018.

YASAR, A. et al. Pathogen regrowth in UASB effluente disinfected by UV, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and advanced oxidation processes. **Ozone Sci. Eng.**, v. 29, p. 485–492, 2007.

- YIM, G. et al. Complex integrons containing qnrB4-ampC (bla DHA-1) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from wastewater. **Canadian journal of microbiology**, v. 59, n. 2, p.110-116, 2013
- YOUNG, B. J., et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.
- YU, Y.; WU, L.; CHANG, A. C. Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 310-316, 2013.
- ZEGURA, B. et al. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453-1460, 2009.
- ZEKAR, F.M. et al. From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1569, 2017.
- ZHANG, T.; SHAO, M. F.; YE, L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1137-1147, 2012.
- ZHANG, Y.; MARRS, C.F.; SIMON, C. C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3702-3706, 2009.
- ZHANG, Y.; ZHOU, J. L. Occurrence and removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater. **Chemosphere**, v. 73, n. 5, p. 848-853, 2008.
- ZHOU, H. et al. Behaviour of selected endocrine-disrupting chemicals in three sewage treatment plants of Beijing, China. **Environmental monitoring and assessment**, v. 161, n. 1, p. 107-121, 2010.
- ZHUANG, Y. et al. Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.22, p.7037–7044, 2015.
- ZIMMERMANN, S. G. et al. Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection. **Water research**, v. 45, n. 2, p. 605-617, 2011.
- ZURFLUH, K. et al. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. **Intern. J. of Antimicrobial Agents**, v.50, n.3, p. 436-440, 2017.