RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/09/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE ÁGUAS RESIDUAIS APÓS APLICAÇÃO DE TRATAMENTO TERCIÁRIO MULTIBARREIRA

BRUNA ASSUNÇÃO BECHTOLD BELÃO

Rio Claro – SP
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE ÁGUAS RESIDUAIS APÓS APLICAÇÃO DE TRATAMENTO TERCIÁRIO MULTIBARREIRA

BRUNA ASSUNÇÃO BECHTOLD BELÃO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).
Orientadora: Dra. Dânia Elisa Christofoletti Mazzeo Morales.
Coorientadora: Dra. Laís Roberta Deroldo Sommaggio

Rio Claro – SP
2025

B426a

Belão, Bruna Assunção Bechtold
Avaliação fitotóxica e genotóxica de águas residuais após aplicação de tratamento terciário multibarreira / Bruna Assunção Bechtold Belão. -- Rio Claro, 2025
111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Dânia Elisa Christofoletti Mazzeo Morales
Coorientadora: Laís Roberta Deroldo Sommaggio

1. Fitotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Tratamento de efluentes. 4. Sistema multibarreira. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A crescente demanda por água e a disponibilidade limitada desse recurso no cenário mundial demonstram a necessidade da implementação de medidas que promovam a proteção e preservação dos recursos hídricos. Diante das limitações dos tratamentos convencionais realizados pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), especialmente quanto à remoção de poluentes emergentes e microrganismos, torna-se necessária a adoção de tecnologias complementares mais eficientes. A organização mundial das Nações Unidas (ONU), anunciou um plano de ação global em 2015, com 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) e 169 metas para erradicação da pobreza e promoção de uma vida digna a todos (Agenda 2030 da ONU). Tendo em vista os 17 ODS, destacam-se aqueles relacionados à promoção da disponibilidade de água e ao aprimoramento da gestão sustentável da água e do saneamento para todos. Isso inclui o tratamento de efluentes, a reciclagem e o desenvolvimento de tecnologias efetivas para o reuso da água. Diante desse contexto, o presente estudo contribui para a avaliação da eficiência de um sistema de tratamento multibarreira na produção de efluentes sanitários com melhor qualidade, visando à promoção de uma gestão sustentável das águas residuais, com ênfase em sua reutilização segura e responsável.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The increasing demand for water and the limited availability of this resource in the global context highlight the need for implementing measures that promote the protection and preservation of water resources. Due to the limitations of conventional treatments carried out by Wastewater Treatment Plants (WWTP), especially regarding the removal of emerging pollutants and microorganisms, the adoption of more efficient complementary technologies becomes essential. The United Nations announced a global action plan in 2015, with 17 sustainable development goals and 169 targets for the eradication of poverty and the promotion of a dignified life for all (UN Agenda 2030). Among these goals, particular emphasis is placed on those related to promoting water availability and improving the sustainable management of water and sanitation for all. This includes wastewater treatment, recycling and the development of effective technologies for water reuse. In this context, the present study contributes to the evaluation of the efficiency of a multi-barrier treatment system for producing higher-

quality effluents, aiming to support the sustainable management of wastewater with an emphasis on its safe and responsible reuse.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE ÁGUAS RESIDUAIS APÓS APLICAÇÃO DE TRATAMENTO TERCIÁRIO MULTIBARREIRA

AUTORA: BRUNA ASSUNÇÃO BECHTOLD BELÃO
ORIENTADORA: DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES
COORIENTADORA: LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
DANIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORAI
Data: 22/09/2025 15:32:07-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES (Participaçao Virtual)
Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal - Centro de Ciências Agrárias / UFSCar - Campus Araras / SP

gov.br Documento assinado digitalmente
SILVIA TAMIE MATSUMOTO
Data: 22/09/2025 12:10:31-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. SILVIA TAMIE MATSUMOTO (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Espírito Santo

gov.br Documento assinado digitalmente
DANIELA MORAIS LEME
Data: 29/09/2025 16:58:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. DANIELA MORAIS LEME (Participaçao Virtual)
Departamento de Genética / Universidade Federal do Paraná

Rio Claro, 19 de setembro de 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de realizar mais um sonho e por me conceder saúde, sabedoria e força para seguir nessa jornada.

Gostaria de dizer que a conclusão do mestrado não seria possível se nesse percurso eu não tivesse o apoio e confiança de muitas pessoas, às quais sou profundamente grata.

Aos meus familiares, especialmente meu marido Caio, meu filho Bento, meus pais Marco e Elizabete e meu irmão Gabriel, expresso meu carinho e agradecimento pelo apoio incondicional, incentivo, compreensão e ajuda durante todos os momentos desta caminhada. O Bento chegou durante o desenvolvimento deste projeto e me mostrou o que realmente é força e determinação, obrigada filho. Também agradeço a família do Caio que é minha segunda família, por todo o auxílio com o Bento nesse processo.

Agradeço à minha orientadora Dânia e coorientadora Lais, pela dedicação, paciência e orientação durante todo o processo. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho e são exemplos de pesquisadoras.

A todos da empresa Mérieux NutriSciences pelo apoio e por permitir que uma parte do projeto fosse realizado lá. Agradeço especialmente ao Eugênio, Marcelo, Luis Paulo e todos os meus colegas do laboratório de Toxicologia *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Renato Falcão Dantas, pela parceria deste projeto e por disponibilizar o laboratório para realização do tratamento multibarreira. À Jacqueline, pela ajuda com as coletas e também com os tratamentos realizados. Agradeço por essa colaboração tão significativa.

Às Profas. Marin e Dejanira por disponibilizarem seus laboratórios para a realização de parte dos ensaios. À Adriana, pelo apoio, ensinamento e ajuda durante minhas atividades no laboratório. A todos os meus colegas do laboratório que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Thomaz e Letícia Gigeck por se prontificarem a me ensinar sobre o ensaio de *A. cepa*.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia pelos ensinamentos e suporte durante todo esse período.

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

Enfim, nada seria possível se eu não tivesse o suporte de pessoas tão especiais como vocês. Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender” (Marie Curie)

RESUMO

A obtenção de águas residuais de melhor qualidade é uma estratégia de proteção e preservação dos recursos hídricos. Por esta razão, o sistema de tratamento multibarreira tem se mostrado promissor e caracteriza-se pela combinação de técnicas avançadas de tratamento de efluentes, como a ozonização (O_3), adsorção por carvão ativado granular (CAG) e filtração por membranas (MP), atuando juntos na remoção de poluentes remanescentes e na desinfecção de microrganismos presentes. Assim, o presente estudo buscou avaliar e monitorar a efetividade do tratamento multibarreira por meio de análises físico-químicas, ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa* e ensaios de citogenotoxicidade com *Allium cepa* e do micronúcleo em células CHO-K1, por citometria de fluxo. As amostras de efluentes sanitários foram coletadas em abril e setembro de duas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) da cidade de Limeira, e submetidas aos seguintes tratamentos: O_3, O_3/CAG, O_3/CAG/O_3 e O_3/CAG/O_3/MP. A partir das análises físico-químicas, foi possível notar uma melhora de todos os parâmetros analisados no decorrer dos tratamentos, destacando os tratamentos O_3/CAG/O_3 e O_3/CAG/O_3/MP com valores abaixo do limite de detecção do equipamento. Os resultados com *L. sativa* revelaram inibição do crescimento radicular, indicando fitotoxicidade após O_3/CAG/O_3 e O_3/CAG/O_3/MP (abril) e O_3 e O_3/CAG/O_3/MP (setembro) da ETE Águas da Serra; para a todos os tratamentos do sistema multibarreira (abril) e efluente secundário e O_3/CAG (setembro) da ETE Tatu. No bioensaio com *A. cepa* foi observado uma diminuição no índice mitótico, sugerindo citotoxicidade para todas as amostras da coleta de abril em ambas as ETE, com exceção da O_3/CAG/O_3/MP. Com relação às coletas de setembro, foi observada citotoxicidade para a ETE Águas da Serra apenas em O_3/CAG/O_3/MP e na ETE Tatu antes do tratamento (efluente secundário). Na avaliação de genotoxicidade, tanto em *A. cepa* quanto em cultura de células CHO-K1, nenhuma das amostras estudadas apresentaram potencial genotóxico. Portanto, os resultados indicam o potencial fitotóxico das amostras após sistema multibarreira O_3/CAG/O_3 e O_3/CAG/O_3/MP. Em alguns casos, o GAC foi eficiente na remoção de subprodutos gerados após O_3, enquanto em outros, não removeu completamente essas substâncias. Dessa forma, a utilização de diferentes bioensaios para a avaliação da toxicidade de efluentes sanitários submetidos a tratamentos terciários contribui para o desenvolvimento de

estratégias voltadas ao reuso seguro desses efluentes, de modo a não comprometer a saúde humana e o meio ambiente.

Palavras-chave: *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, Micronúcleo *in vitro*, ozonização, carvão ativado granular, filtração por membrana, reuso de água.

ABSTRACT

Obtaining higher-quality wastewater is a strategy for protecting and preserving water resources. For this reason, the multi-barrier treatment system has proven to be promising and is characterized by the combination of advanced effluent treatment techniques, such as ozonation (O_3), granular activated carbon (GAC) adsorption, and membrane filtration (MP), which work together to remove remaining pollutants and disinfect present microorganisms. Thus, this study aimed to evaluate and monitor the effectiveness of the multi-barrier treatment through physicochemical analyses, phytotoxicity assays with *Lactuca sativa*, and cytogenotoxicity assays with *Allium cepa* and the micronucleus test in CHO-K1 cells using flow cytometry. Sanitary effluent samples were collected in April and September from two Wastewater Treatment Plants (WWTPs) in the city of Limeira and subjected to the following treatments: O_3, O_3/GAC, O_3/GAC/O_3, and O_3/GAC/O_3/MP. Physicochemical analyses showed improvement in all analyzed parameters throughout the treatments, with the O_3/GAC/O_3 and O_3/GAC/O_3/MP treatments standing out, presenting values below the detection limit of the equipment. The results with *L. sativa* revealed inhibition of root growth, indicating phytotoxicity after the O_3/GAC/O_3 and O_3/GAC/O_3/MP treatments (April) and O_3 and O_3/GAC/O_3/MP treatments (September) at the Águas da Serra WWTP; and for all multi-barrier treatments (April) as well as the secondary effluent and O_3/GAC treatment (September) at the Tatu WWTP. In the *A. cepa* bioassay, a decrease in the mitotic index was observed, suggesting cytotoxicity for all samples collected in April from both WWTPs, except for the O_3/GAC/O_3/MP treatment. For the September samples, cytotoxicity was observed only in the O_3/GAC/O_3/MP treatment at the Águas da Serra WWTP and in the untreated secondary effluent at the Tatu WWTP. In the genotoxicity assessment, neither *A. cepa* nor CHO-K1 cell cultures showed genotoxic potential in any of the samples analyzed. Therefore, the results indicate the phytotoxic potential of the samples following the O_3/GAC/O_3 and O_3/GAC/O_3/MP multi-barrier treatment systems. In some cases, GAC was effective in removing by-products generated after ozonation, while in others, it did not completely eliminate these substances. Thus, the use of different bioassays to evaluate the toxicity of sanitary effluents subjected to tertiary treatments contributes to the development of strategies aimed at the safe reuse of these effluents, so as not to compromise human health and the environment.

Keywords: *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, *In vitro* micronucleus, ozonation, granular activated carbon, membrane filtration, water reuse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Consumo de água em diversas atividades no Brasil, em 2023... 26
Figura 2. Principais etapas do tratamento de esgoto.. 29
Figura 3. Amostra de efluente submetida a tratamento de ozonização pelo gerador de ozônio OzonAr.....41
Figura 4. Amostra de efluente submetida a tratamento de carvão ativado granular. Fonte: autora. 41
Figura 5. Amostra de efluente submetida a tratamento de Membrana de poliacrilonitrila.....42
Figura 6. Esquema do sistema de tratamento multibarreira.. 42
Figura 7. Amostras de efluentes secundários após coleta, antes de serem submetidos ao tratamento multibarreira.. 43
Figura 8. Amostras de efluente da ETE Águas da Serra antes e após o tratamento terciário multibarreira.....44
Figura 9. Plataforma de fotoativação para o corante Dye A (EMA).. 52
Figura 10. Processo de marcação das células mortas/processo de morte celular (coloração vermelha) versus núcleos e micronúcleos de células saudáveis (coloração verde).. 53
Figura 11.Figura ilustrativa gerada pelo citômetro de fluxo BD Accuri C6 Plus após aquisição de uma amostra.Configuração dos gates no equipamento e aquisição de eventos de uma amostra não citotóxica (1) e outra citotóxica (2).. 56
Figura 12. Figura ilustrativa gerada pelo citômetro de fluxo BD Accuri C6 Plus após aquisição de um controle negativo (1) e um controle positivo (2).....57

Artigo 1

Figura 1. Média do crescimento (milímetro - mm) dos hipocótilos de *Lactuca sativa* expostas às amostras de efluentes antes e após tratamentos de ozonização (O_3), Carvão Ativado Granular (CAG) e Membrana de policrilonitrila (MP)... 75
Figura 2. Média do crescimento (milímetro – mm) das radículas de *Lactuca sativa* expostas às amostras de efluentes antes e após, tratamentos de ozonização (O3), Carvão Ativado Granular (CAG) e Membrana (MP)... 77

Figura 3. Índice de germinação de *Lactuca sativa* expostas às amostras de efluentes antes e após, tratamentos de ozonização (O3), Carvão Ativado Granular (CAG) e Membrana (MP)..... 82
Figura 4. Índice Mitótico das células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas às amostras de efluentes antes e após tratamentos de ozonização (O3), Carvão Ativado Granular (CAG) e Membrana (MP).....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média de precipitação e temperaturas mensais do ano de 2023, em que foram realizadas as coletas. 40
Tabela 2. Resumo das condições de exposição das células CHO-K1 aos tratamentos. 50

Artigo 1

Tabela 1. Caracterização das amostras de efluentes provenientes da ETE Águas da Serra e ETE Tatu, antes e após aplicação do tratamento terciário multibarreira, coletados em abril 2023.. 70
Tabela 2. Caracterização das amostras de efluentes provenientes da ETE Águas da Serra e ETE Tatu, antes e após aplicação do tratamento terciário multibarreira, coletados em setembro 2023.. 71
Tabela 3. Média e desvio padrão da porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* expostas às amostras de efluentes coletados antes e após tratamento multibarreira... 73
Tabela 4. Média e desvio padrão da porcentagem de germinação de sementes de *Allium cepa* expostas às amostras de efluentes coletados antes e após tratamento multibarreira.. 83
Tabela 5. Média e desvio padrão das alterações genotóxicas e mutagênicas observadas para as células de *Allium cepa* expostas às amostras de efluentes da ETE Águas da Serra e ETE Tatu, antes e após tratamento multibarreira... 86
Tabela 6. Frequência de micronúcleos e porcentagem de RICC do efluente da ETE Águas da Serra, antes e após todos os tratamentos realizados, para as três condições de exposição do ensaio de Micronúcleo *in vitro*, na coleta realizada em abril e setembro..... 88
Tabela 7. Frequência de micronúcleos e porcentagem de RICC do efluente da ETE Tatu, antes e após todos os tratamentos realizados, para as três condições de exposição do ensaio de Micronúcleo *in vitro*, na coleta realizada em abril e setembro..... 89
Tabela S1. Média de precipitação e temperaturas mensais do ano de 2023, em que foram realizadas as coletas.....99

Tabela S2. Valores referentes ao pH e osmolalidade das amostras de efluente da Tatu, antes e após tratamento terciário.....99
Tabela S3. Valores referentes ao pH e osmolalidade das amostras de efluente da Tatu, antes e após tratamento terciário.....99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico
ANOVA	Análise de variância
APHA	*American Public Health Association*
ATCC	*American Type Culture Collection*
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BD	Becton Dickinson
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BPL	Boas práticas de laboratórios
CAG	Carvão ativado granular
CHO-K1	Linhagem celular derivada da linhagem do ovário de hamster chinês
CN	Controle negativo
CO_2	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Controle positivo
CR	Crescimento relativo
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EMA	*Ethidium monoazide*
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FSC	*Forward scatter*
GR	Germinação relativa
HCl	Ácido clorídrico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IG	Índice de germinação
IGe	Índice de genotoxicidade
IM	Índice mitótico
LD	Limite de detecção
MCC	Meio de cultura completo
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo
MP	Membrana de poliacrilonitrila

NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O_3	Ozonização
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OECD	*Organization for Economic Co-operation and Development*
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização mundial das Nações Unidas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
POA	Processo oxidativo avançado
pH	Potencial hidrogeniônico
RICC	*Relative Increase in Cell Counts*
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
S9	Fração microsomal
SAB	*Sabouraud Dextrose Agar*
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SSC	*Side scatter*
SST	Sólidos Suspensos Totais
TSA	*Tryptic Soy Agar*
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
USEPA	*U.S. Environmental Protection Agency*
UV	Ultravioleta
WHO	*World Health Organization*
WWAP	*World Water Assessment Programme*

SUMÁRIO

1. Introdução 21
2. Objetivo 24
3. Revisão da literatura 25
3.1 Consumo e escassez de água 25
3.2 Tratamento de Esgoto 27
3.2.1 Tratamento Multibarreira 30
3.3 O reuso de água 32
3.4 Ensaios biológicos para monitoramento da toxicidade de efluentes 33
3.4.1 Bioensaio com *Lactuca sativa* 34
3.4.2 Bioensaio com *Allium cepa* 35
3.4.3 Bioensaio com células CHO mantidas em cultura 36
4. Material e Métodos 39
4.1 Efluentes 39
4.2 Tratamento Multibarreira 40
4.3 Caracterização dos efluentes antes e após submissão ao tratamento multibarreira 44
4.4 Ensaio com organismos vegetais 45
4.4.1 Ensaio de fitotoxicidade com Lactuca sativa 45
4.4.2 Ensaio de citogenotoxicidade com *Allium cepa* 46
4.4.3 Análise estatística dos ensaios com vegetais 47
4.5 Ensaio de genotoxicidade com cultura de células CHO-K1 47
4.5.1 Linhagem celular 48
4.5.2 Preparo de amostras 48
4.5.3 Teste preliminar para a escolha da concentração da amostra de efluente a ser utilizada no ensaio de micronúcleo 49
4.5.4 Ensaio do Micronúcleo 50
4.5.5 Citometria de Fluxo 52
5 Resultados e Discussão 58
Artigo 1: Avaliação da fitotoxicidade e genotoxicidade de efluente após aplicação de tratamento terciário multibbareira para reuso 58
6 Considerações finais 100
7 Referências Bibliográficas 102

1. Introdução

A disponibilidade de água potável é essencial para a sobrevivência humana, no entanto, a escassez desse recurso natural apresenta-se como um dos grandes desafios globais da atualidade considerando a alta demanda desse recurso. Frente a isso, algumas ações mais sustentáveis vêm sendo implementadas, como as de reuso da água e redução de desperdícios, além da conservação de mananciais e desenvolvimento de tecnologias mais efetivas no tratamento de esgoto, a fim de garantir a proteção ao ecossistema aquático e o fornecimento de água de qualidade à população (ANA, 2021). A prática de reuso de águas residuais já é realidade em muitos países como Espanha, Itália, Alemanha, Grécia e França, estes foram os que utilizaram os maiores volumes de água de reuso em 2020 (Alcalde; Sanz; Gawlik, 2014; Florides *et al.,* 2024; Mannina; Gulhan; Ni, 2022).

As águas residuais devem passar por tratamentos nas ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) antes de serem lançadas no ambiente (Igere; Okoh; Nwodo, 2020). O tratamento convencional (processos físicos e biológicos) realizado pelas ETE, têm função de remover os poluentes presentes nos efluentes e diminuir a quantidade de contaminantes orgânicos, inorgânicos e microbiológicos (Carvalho; Oliveira, 2010; Sommaggio, 2021). No entanto, esse tratamento convencional pode ser insuficiente na remoção completa de compostos orgânicos e microrganismos, e quando os efluentes não são propriamente tratados, contaminam significativamente as águas receptoras, conferindo a necessidade da realização de tratamentos complementares (Da Silva *et al*., 2021; Lopez *et al.*, 2022).

O emprego de tratamento terciário pelas ETE garante a melhor qualidade do efluente final, por eliminar a presença de patógenos e outros poluentes que persistiram nas etapas anteriores (Malvestiti *et al.*, 2024; Sommaggio *et al.*, 2024). Desse modo, o sistema multibarreira é caracterizado pela combinação de diferentes métodos de tratamento que atuam como barreiras sucessivas, incluindo processos oxidativos avançados (POA), como a O_3 (ozonização), que é responsável pela oxidação de compostos orgânicos; a adsorção por carvão ativado granular (CAG) que promove a remoção de compostos orgânicos e inorgânicos; e a filtração por membranas, a qual atua como barreira física para contaminantes biológicos e

químicos, contribuindo para a eliminação de compostos de difícil degradação (Da Silva *et al.*, 2021; Shi *et al*., 2021).

Os ensaios biológicos constituem ferramenta indispensável para o monitoramento da ecotoxicidade de efluentes, fornecendo informações essenciais à gestão adequada das águas residuais e à compreensão dos efeitos tóxicos dos poluentes (Alygizakis, 2023; Prasse *et al*., 2015; Sommaggio *et al*., 2022; Sommaggio *et al*., 2024).

O bioensaio com *Lactuca sativa* destaca-se na avaliação de risco de contaminação ambiental, sendo utilizado para avaliar a fitotoxicidade a partir da observação de efeitos sobre a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas (Aragão *et al*., 2021; Mazzeo *et al*., 2020). Trata-se de um método simples, de baixo custo, altamente sensível e reprodutível (Priac; Pierre-Marie; Crini, 2017; Souza *et al*., 2020). A espécie *Allium cepa* apresenta-se como um eficiente modelo biológico para avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de diferentes compostos e misturas ambientais, em razão de sua elevada sensibilidade e da facilidade de observação de seus cromossomos (Alias *et al*., 2023; Leme; Marin-Morales, 2009; Sommaggio *et al*., 2018). Dessa forma, o emprego de ambos os ensaios vegetais pode garantir uma melhor triagem das substâncias presentes em amostras complexas.

Estudos utilizando sistemas *in vitro* também têm se destacado devido a condições experimentais controláveis, como disponibilidade, reprodutibilidade e facilidade na obtenção dos resultados (Hara; Marin-Morales, 2017; Rabello-Gay; Rodrigues, 1991). Diversas linhagens celulares de roedores como CHO, V79, CHL/IU e L5178Y ou linhagens humanas como a TK6, são bastante utilizadas para avaliar o potencial genotóxico de poluentes ambientais, conforme descrito no Guideline OECD 487 (2023). As células CHO-K1 (de ovário de Hamster Chinês) são amplamente utilizadas para investigar danos ao DNA, pois apresenta um ciclo celular curto e facilidade de crescimento em cultura, sendo também indicadas para a avaliação ecotoxicológica de efluentes (Hara; Marin-Morales, 2017; Preston *et al*., 1987).

Um dos principais testes para o biomonitoramento ambiental de agentes tóxicos (Sommer; Buraczewska; Kruszewski, 2020), visando um *screening* de contaminantes capazes de induzir alterações genéticas é o ensaio do micronúcleo (MN) (Diaz *et al*., 2007). Quando realizado em citometria de fluxo, os resultados são obtidos mais

rapidamente, com maior precisão e certeza estatística (Sommer; Buraczewska; Kruszewski, 2020).

Frente ao exposto anteriormente, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial ecotoxicogenético das amostras de efluentes sanitários, antes e após a aplicação do tratamento multibarreira, por meio de ensaios de fitotoxicidade com *L. sativa*, citogenotoxicidade com *A. cepa* e genotoxicidade com células CHO-K1, comparando a efetividade das diversas etapas do processo e dos bioensaios como ferramentas para a avaliação do potencial tóxico dos efluentes. Foram levantadas as hipóteses de que (1) o tratamento multibarreira reduziria significativamente o potencial fitotóxico, citotóxico e genotóxico dos efluentes sanitários, e (2) as diferentes etapas do processo apresentariam eficiências distintas, as quais poderiam ser detectadas por meio de variações nos níveis de fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade das amostras.

6 Considerações finais

O presente estudo foi capaz de fornecer resultados importantes quanto ao tratamento de efluentes sanitário pelo sistema multibarreira proposto, buscando compreender os efeitos biológicos após cada etapa do tratamento. Dessa forma, foi possível concluir que:

- A partir do bioensaio com *L. sativa* foi detectar a fitotoxicidade das amostras, sendo observado uma inibição do crescimento da radícula para as amostras após os tratamentos de O_3/CAG/ O_3 e O_3/CAG/ O_3/MP (abril) e O_3 e O_3/CAG/ O_3/MP (setembro) da ETE Águas da Serra, além de todas as amostras do tratamento multibarreira da ETE Tatu (abril). Quanto à avaliação do hipocótilo, foi observada indução de seu crescimento para todos os tratamentos, de ambas as ETEs, nos dois períodos avaliados.
- Os tratamentos não afetaram a capacidade de germinação das sementes de *L. sativa* e *A. cepa*;
- Constatou-se uma diminuição do índice mitótico de *A. cepa* para as amostras das duas ETE na coleta de abril, com exceção do tratamento O_3/CAG/O_3/MP. Já na coleta de setembro, para a ETE Águas da Serra a diminuição ocorreu somente para o tratamento O_3/CAG/O_3/MP, enquanto que para a ETE Tatu foi restrita apenas ao efluente secundário.
- Com relação aos compostos citotóxicos presentes nas amostras, para as coletas de abril de ambas as ETE, foi possível observar uma melhora na qualidade do efluente após o tratamento multibarreira completo (O_3/CAG/O_3/MP). No entanto, para a amostra da ETE Águas da Serra em setembro, isso não foi observado, indicando variação sazonal dos efluentes.
- Não foram observados efeitos genotóxicos e mutagênicos nas células de *A. cepa* expostas as amostras de efluentes estudadas;
- O tratamento com CAG mostrou-se efetivo na remoção de subprodutos fitotóxicos da ozonização para a coleta de setembro da ETE Tatu, no entanto, tanto para ETE Águas da Serra (setembro) quanto para ETE Tatu (abril) esse tratamento não removeu completamente essas substâncias. Com relação aos efeitos citotóxicos, o CAG pareceu não contribuir para sua diminuição;
- O tratamento com a membrana de poliacrilonitrila não foi tão eficiente na remoção de compostos fitotóxicos, podendo estar relacionado à saturação de

seus poros para essas substâncias. No entanto, com relação as substâncias citotóxicas, foi observada uma melhora da qualidade do efluente após a passagem na MP para as coletas de abril;

- No ensaio de MN com cultura de células CHO-K1 não foram observados resultados estatisticamente significativos para o parâmetro de citotoxicidade e genotoxicidade com as amostras estudadas;
- O citômetro de fluxo, empregado para a análise desse ensaio, mostrou-se efetivo na avaliação da genotoxicidade das amostras, obtendo resultados seguros e reprodutíveis;
- A avaliação da genotoxicidade das amostras de efluentes utilizando células CHO-K1 é relevante, pois permite estudar possíveis efeitos desses efluentes em células de mamíferos, auxiliando em procedimentos iniciais para serem estabelecidos quando propostos novos métodos de tratamento de efluentes;
- A variação dos efeitos nos organismos vegetais pode estar relacionada à diferença da composição das águas residuais devido a fatores como a sazonalidade, diferença das atividades antrópicas e industriais;

É extremamente importante estudar novas metodologias que auxiliem e melhorem o processo de tratamento de águas residuais, pois ao melhorarmos a qualidade do efluente final, estaremos protegendo o ecossistema aquático e também a saúde humana.

7 Referências Bibliográficas

AGUILAR-ASCON, E.; MARRUFO-SALDAÑA, L.; BARRA-HINOJOSA, J. A. Toxicity Assessment of Tanning Effluents Treated via Electrocoagulation and Ozonation Using a Bioassay with *Lactuca sativa* L. **Journal of Ecological Engineering**, v. 25, n. 9, p. 316-327, 2024. https://doi.org/10.12911/22998993/190685

ALCALDE SANZ, L.; GAWLIK, B. Water Reuse in Europe - Relevant guidelines, needs for and barriers to innovation. EUR 26947. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2014.

AL-HAZMI, H. E. *et al*. Wastewater reuse in agriculture: Prospects and challenges. **Environmental Research**, v. 236, p. 116711, 2023.

ALIAS, C. *et al*. *Allium cepa* tests: A plant-based tool for the early evaluation of toxicity and genotoxicity of newly synthetized antifungal molecules. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 889, 2023.

ALVES, T. C. *et al*. Influencing factors on the removal of pharmaceuticals from water with micro-grain activated carbon. **Water Research**, v. 144, p. 402-412, 2018. doi:10.1016/j.watres.2018.07.037

ALYGIZAKIS, N. Battery of In Vitro Bioassays: A Case Study for the Cost-Effective and Effect-Based Evaluation of Wastewater Effluent Quality. **Water**, v. 15, p. 619, 2023.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 2017.

ANA (Agência Nacional de Águas). Quantidade de água. 2021. Disponível em:< http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/aguas-no-brasil/panorama-das-aguas/quantidade- da-agua>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2022.

Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (Brasil). Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2024 : informe anual / Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico.- Brasília : ANA, 2024.

https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/gestao-das-aguas/usos-da-agua

ANDRADE, L.F.; DAVIDE, L.C.; GEDRAITE, L.S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of Lactuca sativa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, n. 4, p. 626-631, 2010.

ANGELAKIS, A. N. *et al*. Water reuse: from ancient to modern times and the future. **Frontiers in Environmental Science,** v. 6, p. 26, 2018.

ARAGÃO, F. B. *et al*. Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, 2021.

ARVANITI, O. S. *et al.* Eficácia de processos de tratamento terciário na remoção de diferentes classes de contaminantes emergentes de águas residuais domésticas. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. **16**, n. 148, 2022. https://doi.org/10.1007/s11783-022-1583-y.

BARCELÓ, 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, p. 1–36, 2008.

BASILE, A; MOZIA, S; MOLINARI, R. Current Trends and future Developments on (Bio-) Membranes: Photocatalytic Membranes and Photocatalytic Membrane reactors. Edit: Elsevier, Amsterdam-Netherlands, 2018.

BD - Becton Dickinson. BD Accuri™ C6 Plus FLOW CYTOMETER. Disponível em: < https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/unpublished-pdfs/BD-Accuri-C6-Plus-Brochure.pdf>. Acesso em 13 de Julho de 2025.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malahtion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture, **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.

BOAVENTURA, T. W. **Análise ecotoxicológica de fertilizantes a base de vidros óxidos multicomponentes**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2023.

BONATES, F. H. *et al*. O papel do ozônio no tratamento de água. Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP, Brasil, 2022.

BONCIU, E. *et al*. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191–209, 2018.

BRYCE, S. M. *et al*. Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, n. 4, p. 280–286, 2011.

No dia de combate à poluição, BRK destaca a alta eficiência da Estação de Tratamento de Esgoto Tatu, **BRK**, Limeira, 13 de agosto de 2024. Disponível em: < https://noticiadelimeira.com.br/2024/08/13/no-dia-de-combate-a-poluicao-brk-

destaca-a-alta-eficiencia-da-estacao-de-tratamento-de-esgoto-tatu/ >. Acesso em: 07 de Outubro 2024.

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 21, p. 21475-21483, 2019.

CARVALHO, A. R.; OLIVEIRA, M. V. C. **Princípios básicos do saneamento do meio**. 10 ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2010. 400 p.

CHANDRA, S. *et al*. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using Allium test. **Science of the total environment**, v. 347, n. 1-3, p. 46-52, 2005.

CHATURVEDI, M. *et al*. Emerging contaminants in wastewater: sources of contamination, toxicity, and removal approaches. **Emerging treatment technologies for waste management**. Singapore: Springer Singapore, p. 103-132, 2021.

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.

Environmental Technology, v. 35, p. 1462-1469, 2014.

CHRISTOU, A. *et al.* Sustainable wastewater reuse for agriculture. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 5, n. 7, p. 504-521, 2024.

COELHO, M. P. M. *et al*. Exploring biological properties of sulfa-based copper(II) complexes: in vitro genotoxicity, cytotoxicity (2D and 3D) and mechanistic insights. **Biometals**, v. 38, p. 1551–1567, 2025.

CONTRERAS, J. D. *et al*. Health risks from exposure to untreated wastewater used for irrigation in the Mezquital Valley, Mexico: A 25-year update. **Water Research**, v.123, p.834–850, 2017.

COSTA, R. N. Introdução à Citometria de Fluxo: Um manual básico para iniciantes. Curitiba: Independently published, 2020, p. 1-50.

CUARTUCCI, M. Ultrafiltration, a cost-effective solution for treating surface water to potable standard. **Revista Water Practice & Technology**, v.15, n.2, 2020.

DA SILVA, D. A. *et al*. Combined AOP/GAC/AOP systems for secondary effluent polishing:Optimization, toxicity and disinfection. **Separation and Purification Technology**, v. 263, 2021.

DA SILVA, T. C. *et al*. Use of *Allium cepa* Test in the Ecotoxicological Evaluation of Sanitary Sewage at Different Stages of Treatment in Two Municipal Wastewater Treatment Plants (WWTP). **Water Air Soil Pollut**, v. 236, n. 338, 2025. https://doi.org/10.1007/s11270-025-07985-1

DIAZ, D. *et al*. Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v. 630, p.1–13, 2007.

ERKEKOGLU, P.; GIRAY, B. K.; BAŞARAN, N. 3R Principle and Alternative Toxicity Testing Methods, **Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 101-117, 2011.

FAGUNDES, T. S.; MARQUES, R. C. Challenges of recycled water pricing. **Utilities Policy**, v. 82, p. 101569, 2023.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FLORIDES, F. *et al.* Water Reuse: A Comprehensive Review. **Environments**, v. 11, n. 81, p. 1-19, 2024.

FREITAS, A. S. *et al*. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in Lactuca sativa L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 426–434, 2016.

GOH, P. S.; WONG, K. C.; ISMAIL, A. F. Membrane technology: A versatile tool for saline wastewater treatment and resource recovery, **Desalination**, v. 521, 2022.

GONÇALVES, M. M. C. *et al*. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge, **Environmental Science and Pollution Research**. v. 27, 34495-34502, 2020.

GRANZOTO, M. R. *et al*. Integration of ozone, UV/H2O2 and GAC in a multi-barrier treatment for secondary effluent polishing: Reuse parameters and micropollutants removal, **Science of the Total Environment**, v. 759, 2020.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides, Mutation Research, v. 518, n. 2, p.145-50, 2002.

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 e Brazil), **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 2017.

HOSSAIN, M. Z. Water: the most precious resource of our life, **Global Journal of Advanced Research**, v. 2, p. 1436-1445, 2015.

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.

Instituto Reuso de Água - IRdA, Porcentagem de reuso de água no mundo. Disponível em: <https://reusodeagua.org/producao-de-dados/>. Acesso em: 19 de Julho de 2025.

In Vitro MicroFlow® Standart Format. Litron Laboratories.

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. **Mutation Research,** v. 75, p. 191–202, 1980.

JESUS, R. W. P. *et al.* Niveis, processos e sistema de tratamento de esgotos. In: congresso interdisciplinar – responsabilidade, ciência e ética, 2017.

JJAGWE, J. *et al*. Synthesis and application of Granular activated carbon from biomass waste materials for water treatment: **A review, Journal of Bioresources and Bioproducts**, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jobab. 2021.03.003.

JONES, E. R. *et al*. Country-level and gridded estimates of wastewater production, collection, treatment and reuse, **Earth System Science Data**, v. 13, n. 2, p. 237-254, 2021.

KESARI, K. K. *et al.* Wastewater Treatment and Reuse: a Review of its Applications and Health Implications. **Water Air Soil Pollut**, v. 232, n. 208, p. 2-28, 2021.

KHAN, S. J.; ANDERSON, R. Potable reuse: experiences in Australia, **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 2, p. 55-60, 2018.

LAGERQVISTA, A. *et al*. DNA repair and replication influence the number of mutations per adduct of polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian cells. **DNA Repair**, v. 10, p. 877-886, 2011.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71–81, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LESSA, L. R.; SILVA, M. C. C.; CARIELLO, F. M. R. Fundamentos e aplicações do Allium

cepa L. como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. Revinter, v. 10, n. 03, p. 39 - 48, 2017.

LI, X.; JIANG, L.; LI, H. Application of Ultrafiltration Technology in Water Treatment. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, Sci. 186 012009, 2018.

LIU, D. Q*. et al*. Backwashing behavior and hydrodynamic performances of granular activated carbon blends. **Environmental Research**, v. 184, 109302, 2020.

LOPEZ, F. J. Removal efficiency for emerging contaminants in a WWTP from Madrid (Spain) after secondary and tertiary treatment and environmental impact on the Manzanares River, **Science of The Total Environment**, v. 812, 2022.

MA, T., *et al*. The improved Allium/Vicia root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants, **Mutation Research**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MACAR, T. K. Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in Allium cepa L. **Environmental Science and Pollution Research**., v. 28, p. 2391-2399, 2021.MALVESTITI, J. A. *et al*. Modelling ozone disinfection of secondary effluents in presence of scavengers and metal catalyst: synergistic effect and regrowth. **Journal of Water Process Engineering**, v. 57, 2024.

MALVESTITI, J. A.; SIMÃO, D. C.; DANTAS, R. F. Toxicity and disinfection assessment of metal containing WWTP effluents during ozonation and UV/H2O2, **Journal of Water Process Engineering**, v. 46, 2022, https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102575.

MALVESTITI, J. A. *et al*. Ozonation combined to BAC filtration for secondary effluent treatment containing moderate concentration of heavy metals, **Chemical Engineering Journal**, v. 500, 2024, https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.156899.

MANNINA, G.; GULHAN, H.; NI, B.J. Water Reuse fromWastewater Treatment: The Transition towards Circular Economy in the Water Sector, **Bioresource Technology**, v. 363, 2022.

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. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n.2, p. 1399-1407, 2015.

MAZZEO, D. E. C. *et al*. Effects of biostimulation by sugarcane bagasse and coffee grounds on sewage sludges, focusing agricultural use: Microbial characterization,

respirometric assessment and toxicity reduction. **Waste Management**, v. 118, p. 110–121, 2020.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assy in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, p. 40-46, 2005.

MENDES, S. A**. Avaliação da toxicidade dos Rios do Campo e KM 119 no município de Campo Mourão-PR, sob influência de atividades antrópicas**. 2019. 92f. Dissertação (Mestre em Inovações Tecnológicas)—Campo Mourão - PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 92f. 2019.

MEYERHOFER, J. *et al*. The future of new water in California: City of San Diego North City pure water. Paper presented at the 91st Annual Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference, WEFTEC 2018, 2019.

MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit. Lonza Walkersville, Inc, USA, 2012.

NAWROCKI, J.; KASPRZYK-HORDERN, B. The efficiency and mechanisms of catalytic ozonation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 99, p. 27-42, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, Paris, 2023.

PALMIERI, M. J. *et al*. Cytotoxic andphytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: a comparative approach. **Mutation Research**, v. 763, p. 30-35, 2014.

PALMIERI, M. J. *et al*. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of Allium cepa. **Water Air Soil Pollution**, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PANTANO, G*. et al*. Toxicity of the sawdust used for phosphorus recovery in a eutrophic reservoir: experiments with Lactuca sativa and Allium cepa. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 18276–18283, 2021.

PEDRERO, F., *et al*. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture. Review of some practices in Spain and Greece. **Agricultural Water Management**, v.97, p.1233–1241, 2010.

PETROVIĆ, Z. *et al*. Granulated Activated Carbon as an Efficient Adsorbent for the Removal of Organic Matter from Water. **Eng. Proc**., v. 99,n. 18, 2025. https://doi.org/10.3390/engproc2025099018

PHAN, L. T. *et al*. Effect of ozonation on the biodegradability of urban wastewater treatment plant effluent, **Science of The Total Environment**, v. *812*, 152466, 2022.

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.

PRESTON, R. J.; SAN SEBASTIAN, J. R.; MCFEE, A. F. The in vitro human lymphocyte

assay for assessing the clastogenicity of chemical agentes, **Mutatation Research**, v. 189, p.175-183, 1987.

PRIAC, A.; PIERRE-MARIE, B.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, p. 188-194, 2017.

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**, v. 5, n. 2, p. 508-517, 2014.

RABELLO-GAY, M.; RODRIGUES, M. A. R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

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

SABESP, 2025. Disponível em: <https://www.sabesp.com.br/o-que-fazemos/solucoes-para-esgotos/tratamento-esgotos/o-processo-tratamento>. Acesso em: 17 de Julho de 2025.

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.

SANTOS, A. F. *et al*. Urban Wastewater as a Source of Reclaimed Water for Irrigation: Barriers and Future Possibilities, **Environments**, v. 10, n. 2, p. 17, 2023.

SANTOS, A. S. P. *et al*. A perspective for the acceptance of water reuse: history of the valorization of wastewater throughout the development of Society, **Water Policy**, v. 26, n. 4, p. 336-358, 2024.

SEABRA, I. *et al*. Coupled ozonation with nanofiltration and catalytic nanofiltration for the removal of micropollutants from secondary efluente, **Environmental Science and Pollution Research**, v. 32, p. 6871–6883, 2025. https://doi.org/10.1007/s11356-025-36173-1

SHI, X. *et al*. Significant increase of assimilable organic carbon (AOC) levels in MBR effluents followed by coagulation, ozonation and combined treatments: Implications for biostability control of reclaimed water. **Frontiers of Environmental Science and Engineering***,* v.15, 2021.

SILVA, G. H. R. *et al*. Anaerobic effluent disinfection using ozone: Byproducts formation, **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 6981-6986, 2010. ISSN 0960-8524, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.022.

SILVEIRA, G. L. *et al*. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation

using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L., **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SNIS 2022 (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento): *Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2022.* Brasília: Ministério das Cidades, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/cidades/pt-br/assuntos/snis.

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.

SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions**. International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1534, 2020.

SOMMAGGIO, L. R. D. *et al*. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.

SOMMAGGIO, L. R. D. **Toxicidade de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) antes e após desinfecção por processos oxidativos avançados.** 2021. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2021.

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.

SOMMAGGIO, L. R. D. *et al*. Assessment of phytotoxic potential and pathogenic bacteria removal from secondary effluents during ozonation and UV/H2O2. **Journal of Environmental Management**, 318, 2022.

SOMMAGGIO, L. R. D*. et al*. Influence of ozonation and UV/H2O2 on the genotoxicity of secondary wastewater effluents. **Science of the Total Environment**, v. 919, 2024.

SOUZA, P. M. S. *et al*. PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using *Allium cepa, Lactuca sativa* and HepG2/C3A cell culture. **Chemosphere**, v. 256, p. 1269-85, 2020.

TACKAERT, R. A., *et al*. Demonstrating process robustness of potable reuse trains during challenge testing with elevated levels of acetone, formaldehyde, NDMA, and 1,4-dioxane. **Journal of Water Supply**: **Research and Technology - AQUA**, v. 68, p. 313-324, 2019.

TIQUIA, S. M. Reduction of compost phytotoxicity during the process of decomposition. **Chemosphere**. v. 79, n. 5, p. 506 - 512, 2010.

UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura). Relatório Mundial da ONU sobre o Desenvolvimento da Água- Água para Prosperidade e Paz, 2024. Disponível em: < https://www.unesco.org/reports/wwdr/en/2024/s>. Acesso em: 15 de Junho de 2025.

VATANKHAH, H. *et al*. Simultaneous ozone and granular activated carbon for advanced treatment of micropollutants in municipal wastewater effluent. **Chemosphere**, v. 234, p. 845-854, 2019.

VÖRÖSMARTY, C. J. *et al*. Fresh water. **Millennium ecosystem assessment**, v. 1, p. 165-207, 2005.

WANG, J.; CHEN, H. Catalytic ozonation for water and wastewater treatment: Recent advances and perspective, **Science of the Total Environment**, 2019. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135249

WARSINGER, D. M. *et al*. A review of polymeric membranes and processes for potable water reuse. **Progress in polymer science**, v. 81, p. 209-237, 2018.

WESTERINK, W. M. *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, p. 7-21, 2011.

WHO/UNICEF (World Health Organization/United Nations Children's Fund). 2017. Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene: 2017 Update and SDG Baselines. Geneva/New York, WHO/UNICEF. www.unicef.org/publications/index_96611.html.

World Resources Institute (WRI), (2020) Aqueduct country rankings . Available online: https: //www. wri.org/applications/aqueduct/country-rankings/.

WRI -World resources institute website. 2020. Domestic Water Use Grew 600% Over the Past 50 Years. Disponível em: <https://www.wri.org/blog/2020/02/growth-domestic-water-use>. Acesso em: 17 de Julho de 2025.

WWAP. 2017. The United Nations World Water Development Report 2017: **Wastewater, the untapped resource.** United Nations World Water Assessment Programme (WWAP). Paris, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.

YANG, J. *et al*. Ultrafiltration as tertiary treatment for municipal wastewater reuse. **Separation and Purification Technology**, v. 272, 2021.

YUAN, X., *et al*. Removal of organophosphate esters from municipal secondary effluent by ozone and UV/H2O2 treatments. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 1028-1034, 2015. doi:10.1016/j.seppur.2015.09.052