UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

MARCOS SCHAAF TEIXEIRA DA SILVA

Remoção de (oo)cistos de protozoários e de estrogenicidade
em sistemas combinados de tratamento de esgoto sanitário

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2014

MARCOS SCHAAF TEIXEIRA SILVA

Remoção de (oo)cistos de protozoários e de estroginicidade
em sistemas combinados de tratamento de esgoto sanitário

Tese apresentada à Escola de Engenharia
de São Carlos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências:
Engenharia Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Daniel

São Carlos

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Marcos Schaaf Teixeira da Silva
3586r Remoção de (oo)cistos de protozoários e de
estrogenicidade em sistemas combinados de tratamento de
esgoto sanitário / Marcos Schaaf Teixeira da Silva
Silva; orientador Luis Antonio Daniel Daniel. São
Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Protozoários. 2. Esgoto. 3. Estrogenicidade. 4.
Cryptosporidium. 5. Giardia. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Tecnólogo **MARCOS SCHAAF TEIXEIRA DA SILVA.**

Título da tese: "Remoção de [oo]cistos de protozoários e de estrogenicidade em sistemas combinados de tratamento de esgoto sanitário".

Data da defesa: 08/08/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Carlos Magno de Sousa Vidal**
(Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO)

Aprovado

Profa. Dra. **Lyda Patrícia Sabogal Paz**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Profa. Dra. **Cristina Filomena Pereira Rosa Paschoalato**
(Universidade do Ribeirão Preto/ANAERP)

Aprovado

Profa. Dra. **Luciana Urbano dos Santos**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedicatória

Dedico esta tese a minha querida família,
em especial ao meu Pai que
sempre me incentivou.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho.

Às minhas irmãs Milena, Sabrina e seus queridos filhos: Clara, Luca, Matteo e aos outros que virão.

Aos amigos de projeto: Raphael, Gabriela, Natália e Bruno, e ao Alcino pela prestação dos serviços e montagem dos experimentos.

À técnica Maria Tereza pelos ensinamentos laboratoriais.

A todos os amigos que tive a honra de conhecer nesses 4 anos de caminhada.

À Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao CPNq pela concessão da bolsa de doutorado.

À FAPESP pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao professor orientador e grande pessoa, acima de tudo, Dr. Luiz Antônio Daniel, pelo apoio, conhecimento, amizade e constante orientação no decorrer de todos esses anos.

A todos os professores que dedicam seu tempo a ensinar e, principalmente, a aprender.

E por último, porque é pra sempre, agradeço a minha querida companheira Ana Paula. Mulher que me deu suporte nos momentos difíceis e sempre sorriu nos felizes. Pelo seu carinho, amor e confiança. Que seja pra sempre!

RESUMO

SILVA, M. S. T. **Remoção de microrganismos, (oo)cistos de protozoários e de estrogenicidade em sistemas combinados de tratamento de esgoto sanitário.** 2014. 154 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Atualmente há um grande interesse em estudos voltados para sistema de tratamento de esgoto sanitário. Isso se deve principalmente pela presença de microrganismos e substâncias que podem interferir na saúde humana e ambiental. Dentre os microrganismos patogênicos responsáveis por transmissão de doenças estão os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. No que se refere às substâncias nocivas à saúde humana e ambiental podem ser citados os desreguladores endócrinos que agem sobre o sistema endócrino de homens e animais causando efeitos adversos. Baseado na importância destes estudos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de remoção de protozoários patogênicos - *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. – e da atividade de estrogenicidade em processos de tratamento de esgoto sanitário constituídos por reator UASB, sistema de lodos ativados e filtro de areia. Também foram avaliados os padrões de qualidade dos efluentes do reator UASB e sistema de lodos ativados utilizando sulfato de alumínio e cloreto férrico. A combinação dos processos biológicos sequenciais apresentou robustez em termos de remoção de matéria orgânica, microrganismos indicadores e (oo)cistos. A desinfecção com cloro mostrou-se eficiente em inativar os microrganismos indicadores: coliformes totais e *Escherichia coli*. A atividade estrogênica, avaliada pelo teste YES, foi maior no efluente do lodo ativado e do filtro de areia devido à conjugação dos compostos estrogênicos no esgoto bruto. Detectou-se toxicidade à levedura utilizada no teste YES (*Saccharomyces cerevisiae*), principalmente nas menores diluições, a qual interferiu na expressão da estrogenicidade impossibilitando o cálculo em termos de concentração equivalente de 17 β -estradiol.

Palavras-chave: Protozoários. Esgoto. Estrogenicidade. *Cryptosporidium*. *Giardia*.

ABSTRACT

SILVA, M. S. T. **Removal microorganisms, (oo)cysts of protozoa and estrogenicity in combined wastewater treatment systems.** 2014. 154 f. Thesis (Ph.D.) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2014.

Currently there is great interest in studies related to the wastewater treatment system. This is mainly for the present of microorganisms and substances that can interfere with human and environmental health. Among the pathogens responsible for diDese transmission are protozoa *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. With regard to substances harmful to human and environmental health can cite endocrine disrupters that act on the endocrine system of humans and animals causing adverse effects. Based on the importance of these studies, the present study aimed to evaluate the efficiency of removal of pathogenic protozoa - *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. - Activity and estrogenicity in processes of wastewater treatment consisting of UASB reactor, activated sludge system and sand filter. We also evaluated the quality standards of the effluent of the UASB reactor and activated sludge system using aluminum sulfate and ferric chloride. The combination of hardiness sequential biological processes presented in terms of removal of organic matter, microorganisms and indicators (oo) cysts. The chlorine disinfection proved effective in inactivating microorganisms indicators: total coliforms e *Escherichia coli*. The estrogenic activity, assessed by the YES assay, was higher in the effluent of the activated sludge and sand filter due to a combination of estrogenic compounds in raw sewage. Was detected toxicity to the yeast used in the YES assay (*Saccharomyces cerevisiae*), mainly in the lower dilutions, which interfered with the expression of estrogenicity it impossible to calculate in terms of an equivalent concentration of 17 β -estradiol.

Keywords: Protozoa. Sewage. Estrogenicity. *Cryptosporidium*. *Giardia*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO.....	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 Desreguladores Endócrinos.....	10
3.1.1 Sistema endócrino e os mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.....	11
3.1.2 Ocorrência dos desreguladores endócrinos no meio ambiente	15
3.1.3 Efeitos dos desreguladores endócrinos sobre a saúde humana	18
3.1.4 Estrogênios.....	23
3.1.5 Remoção de micro contaminantes	25
3.2 Protozoários - <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Localização do Sistema de Tratamento de Esgoto (ETE).....	39
4.2 Descrição e monitoramento do sistema de tratamento de esgoto	39
4.3 Parâmetros a serem avaliados	46
4.4 Metodologia para avaliação da estrogenicidade em amostras de esgoto	47
<i>Preparação do meio de análise para o ensaio</i>	51
4.4.1 Procedimento Teste YES.....	53
4.4.2 Análise dos dados do teste YES.....	56
4.5 Métodos para recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	60
4.6 Análise Estatística.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 Resultados da 1 etapa – ensaios físico-químico	66
5.1.1 Resultados dos ensaios preliminares com Jar Test.....	66
5.2 Resultados da 2 etapa - fase inicial da pesquisa.....	80
5.2.1 Monitoramento dos parâmetro físicos-químicos.....	80
5.2.2 Ensaios parasitológicos e microbiológicos.....	92
5.3 Resultados 3 etapa – protozoários e estrogenicidade.....	102
5.3.1 Monitoramento de variáveis físicas e químicas	102
5.3.2 Monitoramento microbiológico do sistema de tratamento.....	107
5.3.2.1 Microrganismos indicadores	107
5.3.2.2 <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp	109
5.3.3 Ensaio de desinfecção.....	1143
5.3.4 Teste de estrogenicidade em amostra de esgoto	114
6. CONCLUSÕES	132
7. SUGESTÕES	133
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

1. INTRODUÇÃO

A demanda cada vez maior de recursos hídricos decorrente do contínuo crescimento populacional, associada à distribuição desigual deste recurso natural, à poluição das águas e às secas sazonais que afetam determinadas regiões do globo, são fatores que vêm estimulando pesquisas sobre novas formas de recuperação e suprimento de água.

A questão do reuso de águas residuárias é muito promissora e em diversos países, onde a água já está escassa, ela se faz necessária. Entre as diferentes alternativas utilizadas pelas sociedades contemporâneas para solucionar ou minimizar este problema, visando à utilização racional e eficiente desse precioso recurso natural, o reuso de águas residuárias é uma opção viável econômica e ambientalmente. Seja ele praticado direta ou indiretamente.

No entanto, para que o reuso de águas residuárias seja seguro é importante que a qualidade dessas águas seja monitorada. Dentre as principais características dos efluentes, um grupo específico de compostos químicos caracterizados pela capacidade de simular ou alterar a atividade hormonal dos seres humanos e animais, vem chamando atenção da comunidade científica. Atribui-se a estas substâncias a capacidade de desregular o sistema endócrino simulando a ação de hormônios naturais e inibindo ou alterando as funções regulares normais dos sistemas imunológicos, nervoso e endócrino.

Esses desreguladores endócrinos, tais como o 17β -estradiol, vêm sendo detectados em efluentes de estações de tratamento de esgoto e em águas superficiais e subterrâneas. Devido às estações de tratamento removê-los de maneira parcial durante todo o processo de tratamento, parte dessas substâncias são descartadas nos corpos receptores. No ambiente, a presença de estrogênios em águas superficiais pode causar efeitos nocivos aos organismos aquáticos como, por exemplo, a intersexualidade de peixes, quando características sexuais femininas são detectadas em peixes machos. Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta comparados a outros compostos orgânicos (como alguns pesticidas), os estrógenos naturais são continuamente introduzidos no ambiente, o que lhes concede um caráter de persistência, além de serem efetivos em níveis de concentração abaixo de ng/L.

Com isso, a problemática dos desreguladores endócrinos vem sendo estudada, desde 1996, pelo Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), como uma das seis áreas de pesquisa mais importantes (ADAMS et al., 2005).

Como também há inúmeras doenças que podem ser veiculadas pela água, o tratamento de esgoto sanitário possui papel essencial na remoção e inativação de microrganismos patogênicos, no intuito de que seu efluente não comprometa os múltiplos usos do corpo d'água receptor.

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão amplamente dispersos no meio ambiente aquático e foram responsáveis por diversos surtos de criptosporidiose e giardiose por veiculação hídrica, tanto em países em desenvolvimento bem, como em desenvolvidos como os Estados Unidos e Finlândia (FRANCO et al., 2001; PEREIRA et al., 2009; WANG ET al., 2011).

Muito tem se pesquisado quanto ao tratamento de água visando ao abastecimento público, mas ainda são escassos os dados disponíveis sobre a remoção e inativação desses protozoários por meio de tratamento de esgoto (CARDOSO et al., 2003; CARRARO et al., 2000; CHENG et al., 2009; HELLER et al., 2004; ROBERTSON et al., 2000; ROSE et al., 1996; SANTOS et al., 2004; WEN et al., 2009).

Com o intuito de melhorar a compreensão a respeito dos mecanismo de remoção, a presente pesquisa visa avaliar o grau de estrogenicidade e a concentração de protozoários em sistemas combinados de tratamento de esgoto sanitário em escala piloto.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudar no sistema de tratamento de esgoto proposto a degradação e remoção da atividade estrogênica do 17β -estradiol, a remoção de microrganismos patogênicos e a remoção de protozoários parasitos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica, nutrientes, microrganismos e da atividade estrogênica no reator UASB no sistema de lodo ativado (variando a idade do lodo), no sistema de filtração por filtro de areia e no sistema de desinfecção por cloro em tanque de contato;
- Avaliar a viabilidade do uso do teste YES (Yeast Estrogen Screen) para a detecção e quantificação da estrogenicidade em amostras de esgoto.
- Avaliar a eficiência do tratamento de esgoto na remoção dos protozoários patogênicos: *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.
- Avaliar a remoção no tratamento de esgoto de microrganismos indicadores: coliformes totais e *Escherichia coli*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Desreguladores Endócrinos

O monitoramento dos microcontaminantes no meio ambiente vem recebendo grande interesse da comunidade científica desde o fim da década de 1970 (HIGNITE e AZARNOFF, 1977; AHERNE et al., 1985) especialmente devido ao reconhecimento dos efeitos deletérios de muitas destas substâncias sobre o meio ambiente e a saúde do homem, dentre eles: toxicidade aquática, genotoxicidade, seleção de bactérias patogênicas resistentes e a desregulação endócrina em animais, incluindo o seres humanos (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; KIM e AGA, 2007; KÜMMERER, 2010).

Muitas substâncias liberadas no ambiente pela atividade humana são capazes de interferir com o sistema endócrino ou hormonal de seres humanos e animais. Estas substâncias, chamadas desreguladores endócrinos (DE), estão presentes em uma variedade de classes químicas, incluindo as drogas sintéticas, pesticidas e compostos usados na indústria e também em produtos de consumo, subprodutos industriais e poluentes, incluindo alguns metais (EFSA, 2013).

O termo "desregulador endócrino (DE)" foi usado pela primeira vez na Conferência Wingspread em Wisconsin nos EUA (1991) para referir-se às substâncias endocrinamente ativas (DEs) que podem causar efeitos adversos à saúde (COLBORN e CORALIE, 1992). De acordo com o programa Internacional de Segurança Química da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization / International Programme on Chemical Safety, sigla em inglês WHO/IPS) um DE é uma substância exógena ou mistura que altera a(s) função(s) do sistema endócrino e são responsáveis por efeitos adversos¹ em um organismo intacto, nos descendentes, ou (sub)populações (WHO/IPCS, 2002). Portanto, somente uma substância que produz toxicidade no organismo intacto através de um mecanismo hormonal ou semelhante, representa um verdadeiro DE.

Nesse contexto, a definição amplamente aceita de um "efeito adverso" é caracterizada por uma mudança na morfologia, fisiologia, crescimento, desenvolvimento, reprodução ou no tempo de vida de um organismo, sistema, ou (sub)população que resulta na diminuição da capacidade funcional, na diminuição da capacidade de compensar um esforço adicional, ou no aumento na suscetibilidade a

¹ Efeito adverso significa toxicidade, ou seja, patologia ou imparidade funcional.

outras influências (WHO / IPCS, 2004). Consequentemente, em contraste com os efeitos adversos, os "efeitos não adversos" podem ser definidos como efeitos biológicos que não causam alterações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas que afetam o bem-estar, crescimento, desenvolvimento ou tempo de vida de um organismo (LEWIS et al., 2002).

Recentemente, diversos estudos científicos procuram avaliar os potenciais efeitos adversos que podem resultar da exposição a substâncias químicas que têm o potencial de interferir com o sistema endócrino. Os efeitos dos DEs na vida selvagem e na saúde humana foram relatados pela primeira vez por Rachel Carson em 1962 no livro *Primavera Silenciosa*. Com o aumento do número de pesquisas na área, alguns destes efeitos deletérios vêm sendo demonstrados (WHO/IPS, 2002).

O sistema endócrino desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase humana, a qual é frequentemente afetada por estímulos exógenos. Uma variedade de agentes sintéticos e naturais apresenta a capacidade de interagir com o sistema endócrino (EFSA, 2013).

Muitas destas substâncias são persistentes no meio ambiente, acumulando-se no solo e no sedimento de rios e podem ser facilmente transportadas por longas distâncias. Além disso, devido a sua persistência, estas substâncias podem se acumular ao longo da cadeia trófica, representando um sério risco à saúde, principalmente dos seres humanos, que se encontram no topo da cadeia alimentar (MEYER et al, 1999).

3.1.1 Sistema endócrino e os mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos

O principal alvo dos DEs é o sistema endócrino, também conhecido como sistema hormonal, que é encontrado em todos os mamíferos, aves e peixes. Ele é constituído por:

- Glândulas localizadas em todo o corpo (Figura 1)
- Hormônios (mensageiros químicos) que são produzidos pelas glândulas e liberadas na corrente sanguínea ou no fluido ao redor das células.
- Receptores em vários órgãos e tecidos que reconhecem e respondem aos hormônios (EDSP/EPA, 2014).

A hipófise (pituitária), o hipotálamo, o pâncreas, a tireóide, os órgãos reprodutores (ovários e os testículos), a paratireóide, as supra-renais (Figura 1) são os principais órgãos que produzem hormônios com diferentes funções .

Figura 1. Glândulas endócrinas em humanos

Fonte: Disponível em: <<http://sistemaendocrino.zip.net>>. Acesso em: 25 mai. 2014.

Os hormônios são sintetizados e armazenados nas glândulas e quando requeridos podem ser liberados na circulação sanguínea. Através da circulação sanguínea, os hormônios podem atingir células-alvo distantes que apresentam receptores específicos para cada tipo de hormônio, localizados geralmente na superfície da membrana plasmática destas células. Todos os hormônios atuam através de receptores específicos presentes nas células-alvo. A união hormônio-receptor é forte, mas não covalente. O sítio de união é esteroespecífico, onde somente se une o hormônio correspondente ou moléculas similares. As estruturas análogas denominadas agonistas se unem aos receptores, ocasionando os mesmos efeitos que o hormônio. As substâncias antagonistas se ligam ao receptor anulando ou reduzindo os efeitos esperados pela ação do hormônio (SODRÉ et al., 2007; GHISELLI, 2007; VEGAS, 2006; LINTELMANN et al., 2003; MARKEY et al, 2003).

Na Figura 2 está ilustrada a ligação de um hormônio ao seu receptor e a ligação de um desregulador endócrino. Um desregulador endócrino pode agir como agonista, potencializando a ação biológica do hormônio, ou como antagonista, anulando ou reduzindo esta ação de forma que o efeito resultante seja adverso ao organismo.

Figura 2. Ilustração de funcionamento dos hormônios e disruptores endócrinos.

Fonte: Disponível em: <www.pkdiet.com>. Acesso em: 25 mai. 2014.

Além disso, um desregulador endócrino pode agir alterando a síntese ou quebra dos hormônios naturais ou de seus receptores, causando o efeito deletério para o organismo.

As principais funções dos hormônios nos seres humanos e seus estados desregulados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - As principais funções dos hormônios nos seres humanos e seus principais distúrbios.

Hormônios	Local de produção	Principais funções	Principais distúrbios	
			Excesso de produção	Baixa produção de hormônios / anormalidades no receptor
Hormônio do crescimento	Glândula pituitária	Aceleração do crescimento	Acromegalia e gigantismo	Dwarfismo
Triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄)	Tireoide	Estímulo do metabolismo celular, controle da inteligência e crescimento	Hipertireoidismo	Hipotireoidismo
Insulina	Pâncreas	Decréscimo de açúcar no sangue	Hipoglicemia	Hiperglicemia
Hormônios: glicocorticóides, os mineralocorticóides e os androgênios	Adrenais ou supra- renais	Controle do metabolismo, imunológico, etc	Síndrome de Cushing	Doença de Addison
Estrogênios (hormônios sexuais femininos)	Ovários	Feminização (menstruação, glândula mamária), desenvolvimento dos óvulos e ovulação	Endometriose, câncer vaginal e de mama	Desenvolvimento de anomalias na genitália feminina e desordem menstrual
Andrógenos (hormônios sexuais masculinos)	Testículos	Virilização, desenvolvimento de testículos, espermatogênese	Prematuro desenvolvimento de características sexuais secundárias	Desenvolvimento de anomalias na genitália masculina, e síndrome da feminização testicular

Fonte: Adaptado de BILA (2005).

Os DEs absorvidos via cutânea, nasal ou oral, passam a interferir no equilíbrio do sistema endócrino, quebrando a sequência natural dos mecanismos de autorregulação e homeostase. Essa interferência no sistema endócrino dependerá da concentração do ligante natural e do órgão-alvo específico, pois a distribuição dos diferentes tipos de receptores varia conforme o tecido. Por exemplo, os receptores ER- α são encontrados principalmente nas mamas e no útero e os ER- β , no osso e no sistema cardiovascular. O estradiol possui elevada afinidade por ambos tipos de receptores, enquanto os fitoesteróides como isoflavonas são mais

seletivos para ER- β (CLAPAUCH et al, 2002; NEWBOLD, 1995).

A ligação entre sítios receptores (Figura 2) e hormônios podem ser bloqueada ou mimetizada de acordo com a forma e distribuição de cargas dos DEs, com isso pode ocorrer o desencadeamento de respostas biológicas inadequadas (SPIRO; STIGLIANI, 2009) como aceleração/atraso ou superprodução/subprodução das mensagens codificadas devido à mimetização, impedimento da regularização das funções normais devido ao bloqueio, amplificação dos sinais hormonais devido à formação de novos receptores (aceleração endócrina), ação enzimática inadequada e destruição do hormônio ou da sua capacidade de realizar as suas funções (BIRKETT, 2003; AMERICAN CHEMISTRY COUNCIL, 2009; SHAW e McCully, 2002; JANOSEK et al, 2006).

3.1.2 Ocorrência dos desreguladores endócrinos no meio ambiente

Os DEs podem originar-se através de: (i) meios naturais, a exemplo dos hormônios femininos (estrogênios), masculinos (androgênios) ou produzidos por plantas (fitoestrogênios); (ii) ou meios sintéticos, como algumas substâncias químicas utilizadas em produtos de limpeza, pesticidas, plásticos, fármacos, cosméticos, tintas ou diversos outros produtos. A Figura 3 ilustra as principais rotas de contaminação e da exposição humana a substâncias químicas. Algumas destas substâncias químicas são prováveis desreguladores endócrinos.

Figura 3. Principais rotas de contaminação dos corpos d'água e exposição dos seres humanos aos micro-contaminantes. Fonte: Adaptado de BRANDT, (2012).

As fontes geradoras de DEs podem ser divididas em dois grupos principais: pontuais e não pontuais. As primeiras possuem sua entrada no meio ambiente bem caracterizada, comumente utilizando-se de recursos hídricos, como os efluentes industriais e esgotos domésticos, por exemplo. As fontes não pontuais são caracterizadas por deposições atmosféricas e escoamentos superficiais, tendo como resultado deposições parciais dos poluentes antes destes atingirem os corpos d'água (GHISELLI; JARDIM, 2007 apud BIRKETT e LESTER, 2003).

Na Tabela 2 estão apresentados alguns exemplos de classes de substâncias com ação desreguladora endócrina comprovada, relacionando seu uso e aplicações.

Tabela 2 - Exemplos de alguns desreguladores endócrinos, usos e/ou aplicações.

Desreguladores endócrinos	Uso/Aplicação
Acrilamida	Tratamento de água e esgoto; produção de papel e celulose
Bensopirenos (PCB)	Asfalto; graxas e óleos minerais
Bifenilas policlorinadas	Plastificantes em tintas, plásticos, pigmentos, papéis, refrigeradores, capacitores elétricos
Bisfenol A	Selantes dentários, cremes, resinas epóxi, tubulações de ar-condicionado, mamadeiras e garrafas plásticas
BTX (Benzeno, tolueno e xilenos)	Tintas, solventes, gasolina, thinner, removedores
Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)	Inseticida
Estireno	Fabricação de plásticos
Fenilfenóis	Desinfetantes
Ftalatos	Fabricação de plásticos e polímeros
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	Erupções vulcânicas, incêndios, queima de combustíveis fósseis, incineração de resíduos
Metais pesados	Componentes metálicos
Organotinas	Fungicida
Metais pesados	Usados em tintas, detergentes, lubrificantes, cosméticos, têxteis, pesticidas, fármacos e plásticos

Fonte: GUIMARÃES, 2005; SILVA, 2009; FONTENELE et al, 2010, MARKEY et al, 2003.

Na Tabela 3 é apresentada a revisão bibliográfica dos estudos realizados no Brasil e seus respectivos resultados referentes à concentração dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α - etnilestradiol em diferentes matrizes aquáticas.

Tabela 3 - Concentração dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α - etinilestradiol em diferentes matrizes aquáticas no Brasil.

	Matriz aquática	17 β -estradiol (ng/L)	17 α - etinilestradiol (ng/L)	Referências
Campinas, SP	Afluente ETE	6700	5800 **	GHISELLI (2006)
	Efluente ETE	5600	500	
	Superficial	1900 - 6000	1200 - 3500	
	Potável	2100 - 2600	1600 - 1900	GEROLIN (2008)
	Bruta	5,67**	444**	
	Tratada	0,92**	275	
	Potável	<320	<90	SODRÉ et al (2010)
Sumaré, SP	Bruta	6,393**	798**	EROLIN (2008)
	Tratada	1,31**	472**	
Araraquara, SP	Efluente ETE	31	*	ARAÚJO (2006)
Córrego Rico, SP	Superficial	8,6 - 30,6	*	LOPES (2007)
Campo Grande, MS	Potável	6,8	>6,25	SOUZA (2008)
	Superficial	>6,5	>25	
	Efluente ETE	*		
Bacia do Rio Atibaia, SP	Superficial	106-6806	*	RAIMUNDO (2007)
UGRHI-13	Afluente ETE	84 - 5960	n.d - 484 $\pm$ 15	MOURA (2009)
	Efluente ETE	n.d - 822	n.d - 192 $\pm$ 3	
Rio de Janeiro, RJ	Esgoto doméstico	*	21	TERNES et al (1999)
Belo Horizonte, MG	Bruta	1,5 - 36	44 - 1918	MOREIRA et al (2009)
	Filtrada***	0,44**	1,24**	
	Superficial	<4 – 37	<5 - 64	MOREIRA et al (2011)
	Efluente	<9,3	<12,4	
	Afluente	<9,3 – 31	<9,3	QUEIROZ et al (2012)
	Efluente	<12,4 – 41,3	<12,4	
Fortaleza, CE	Afluente	<64-300	<100 - 1.380	PESSOA et al (2011)
	Efluente	<64	<100 - 1.000	
	Afluente	<40 – 7.400	<20 – 5.230	SOUZA (2011)
	Efluente	<40 – 4.000	<20 – 1.200	
Curitiba, PR	Afluente	1.1330 – 2.270	600 – 1.260	FROEHNER et al. (2011)
	Efluente	490 – 760	<LD - 470	
Atibaia, SP	Superficial	<45 – 6.800	<17 – 4.390	MONTAGNER e JARDIM (2011)

** média das coletas; * não analisado; ***apenas pré-clorada; n.d. (não detectado); LD (limite de detecção).

Estrogênios são excretados principalmente como conjugados inativos de ácido sulfônicos e glucurônicos, os quais são clivados em esteróides estrogênicos ativos durante os processos de tratamento de esgoto (PURDON et al., 1994).

3.1.3 Efeitos dos desreguladores endócrinos sobre a saúde humana

Os seres humanos podem entrar em contato com os DEs através do solo, da água ou do ar contaminado por produtos químicos. Os alimentos podem ser as fontes desses compostos e além de fitoestrógenos eles podem conter outros desreguladores por contaminação. Quando os produtos químicos industriais são lançados no solo ou na água, eles entram na cadeia alimentar ao serem acumulados nos peixes, nos animais e nas pessoas.

Os DEs também estão presentes em materiais de consumo tais como plásticos, produtos químicos de uso doméstico, tecidos tratados com retardadores de chama (tecidos anti-fogo), cosméticos e sabões antibacterianos. As pessoas que trabalham com inseticidas, fungicidas ou produtos químicos industriais podem estar expostas aos desreguladores endócrinos no próprio local de trabalho.

As crianças que estão sendo amamentadas podem ser potencialmente expostas quando suas mães apresentam um nível elevado de contato com DEs como, por exemplo, mulheres que trabalham com produtos químicos industriais. As lactentes também podem ser expostas tanto a alimentos com fitoestrógenos do leite de soja quanto a alimentos contaminados pelo plastificante presente nas garrafas e latas que armazenam esses alimentos. O feto e a criança em desenvolvimento são mais vulneráveis aos efeitos dos DEs do que o adulto, pois seus órgãos e sistemas ainda estão em formação. Quando o contato com os DEs ocorre durante a gestação ou nos primeiros anos de vida, seus efeitos podem trazer danos irreversíveis à pessoa (DAMSTRA et. al., 2013).

Com relação aos efeitos dos estrogênios exógenos em seres humanos, alguns estudos vêm demonstrando a participação destes compostos na etiologia do câncer de mama e do câncer endometrial (THOMAS, 1984). A hipótese é que o excesso de estrogênio pode aumentar o risco de proliferação das células epiteliais com transformações parciais malignas, além de favorecer a endometriose.

A obesidade é outro fator relacionado aos DEs que vem sendo estudado. As prováveis ações dos DEs estão relacionadas à interferência na diferenciação do adipócito e nos mecanismos de homeostase do peso. No Brasil, as maiores prevalências de obesidade são encontradas nas regiões mais industrializadas do país, portanto, onde potencialmente ocorre maior exposição da população aos DEs

(JUNIOR e FERNANDEZ, 2009).

Embora exista um grande número de pesquisas na área, poucas evidências conclusivas existem a respeito da ação dos desreguladores endócrinos. Se o percentual dessas substâncias, que já foram analisadas, forem confrontados com a lista de produtos químicos sintéticos que não foram avaliados (WHO/UNEP, 2012; EDSP/USEPA, 2012), percebe-se a importância a ser dada futuras pesquisas. Além de que, não estão sendo contabilizados os subprodutos e produtos que não são identificados pelos fabricantes.

Muitos trabalhos atuais estão voltados na avaliação sobre os efeitos dos desreguladores endócrinos, sendo os quatro principais pontos: reprodução, neurocomportamento, função imunológica e câncer (BERGMAN et al, 2013). Essas áreas refletem a continuidade da vida desde a concepção do embrião até a vida adulta. Os hormônios sexuais e os hormônios da tireóide são os principais determinantes do desenvolvimento da função reprodutiva, do sistema nervoso central e do sistema imunológico.

De acordo com os resultados de trabalhos avaliados pela OMS/UNEP, no relatório *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals* (2012), foram definidas as seguintes conclusões a respeito dos principais efeitos sobre a saúde humana:

1. Sistema reprodutivo – O principal fator que limita as conclusões sobre os efeitos dos DEs na saúde reprodutiva humana é a escassez de dados sobre a exposição humana. Portanto, os dados disponíveis atualmente são inadequados para apoiar uma conclusão de que a saúde reprodutiva humana tem sido adversamente afetada pela exposição aos desreguladores endócrinos. Apesar da carência de dados, os possíveis danos causados pelos DEs à reprodução humana pode se tornar plausível visto que: 1) o atual conhecimento sobre as influências dos hormônios endógenos e exógenos em muitos dos processos envolvidos, e 2) a evidência de adversos resultados sobre sistema reprodutivos obtidos a partir de ensaios realizados com animais selvagens e de laboratório expostos aos DEs.
2. Neurocomportamento – DEs podem alterar as ações hormonais em todos estes processos, tornando o sistema nervoso mais suscetível a eventos danosos. Também podem influenciar a plasticidade neural, prejudicando a capacidade de organismos adultos para se adaptar às mudanças ambientais. Alterações neurocomportamentais podem ser associadas com a exposição ao pré-/neonatal

com HAPs (hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados) - principalmente PCB. Embora apresentem consistência razoável, a associação de HAPs a causas de disfunção neurocomportamental nesse período não podem ser comprovadas com os dados disponíveis.

3. Sistema imunológico - Do grande número de compostos com propriedades imunotóxica, apenas alguns geram perturbações endócrinas. Dentre eles são: dietilestilbestrol (DES), bifenilas policloradas (PCBs), dibenzofurados policlorados (PCDFs) e difeniléteres policlorados (PCDES).

4. Câncer - Embora haja plausibilidade biológica e algumas evidências experimentais que DEs contribuem com o câncer humano via hormonal, o estado atual da ciência não fornece evidências claras referentes à causa. Por outro lado, não há informações suficientes para rejeitar completamente a hipótese de que os desreguladores endócrinos tais como PCBs, dieldrin, ou outros compostos ainda não avaliados podem exercer um papel na incidência de câncer (feminino e/ou masculino) de mama, endométrio, próstata e tumores malignos testiculares.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem indícios de que a exposição aos DEs ao longo do tempo aumentaram a incidência de algumas doenças como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Doenças causadas por exposição as DEs durante estudos humanos e animal

Sistemas	Doenças associadas
Reprodutivo/endócrino	Câncer de mama/próstata
	Endometriose
	Infertilidade
	Diabetes/síndrome metabólica
Imunológico	Susceptibilidade à infecções
	Doença auto-imune
Cardiorrespiratório	Asma
	Hipertensão
	Infarte
Neurológico	Alzheimer
	Parkinson
	Deficiência ADHD/ Aprendizagem

Fonte: WHO/UNEP (2012)

A relação entre causa-efeito à saúde humana tem sido muito discutida ultimamente, principalmente no que se refere ao perigo em baixas doses

(DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Apesar dos estudos atuais sugerirem possíveis danos à saúde do homem, eles ainda falham em demonstrar associação causal entre baixo nível de exposição aos DEs e doenças (FONTENELE et al., 2010).

Uma avaliação estruturada e qualitativa, realizada por Martin et al. (2007), dos riscos à saúde humana atribuíveis aos DE com base nos dados disponíveis até o momento, é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação qualitativa do risco dos DE à saúde humana.

Efeitos do DEs	Tendências de Incidência	Associação	Consequência
Sistema reprodutor			
Qualidade do esperma	+	++	+ (?)
Fecundidade e fertilidade	-/+	+	++
Abortos espontâneos	?	+	+
Taxa de nascidos M:F	-/+	+	-/+ (?)
Anomalias do trato reprodutor masculino	-/+	+	+
Prostatite	?	+	++
Endometriose	++	++	++
Puberdade precoce	?	+	-/+ (?)
Síndrome dos ovários policísticos	?	+	++
Redução da lactação	?	++	++
Neurocomportamental			
Desenvolvimento neuropsicomotor	-/+	++	?
Sistema nervoso adulto	?	++	?
Comportamento dependente do gênero	?	+	?
Sistema imunológico			
Prejuízo da função imunológica	+	+	++
Câncer			
Mama	++	-/+	+++
Endométrio	-/+	-/+	++
Testículo	++	+	++
Próstata	++	++	+++
Tireoide	+	-/+	+

?: Ausência de prova e evidência sobre a incidência ou associação, consequência não está claramente definida; -/+: evidência inconclusiva sobre incidência ou associação, consequência é um biomarcador de saúde populacional; +: evidência escassa de crescente incidência ou influência ambiental, associação baseada em dados de animais ou estudos in vitro; consequência gera um impacto significativo na saúde individual; ++: algumas evidências de tendência crescente da incidência ou influência ambiental; evidência epidemiológica de associação com pelo menos um DE ou impacto significativo sobre saúde pública ou individual; +++: um grande impacto tanto na saúde individual quanto coletiva; A: ausência de conhecimento; U: incerteza. Adaptado de Fontenele et al., (2009).

Outra questão levantada por pesquisadores está relacionada com a interpretação do termo "sistema endócrino". A questão é se esse termo deve ser restrito ao sistema hormonal de vertebrados ou também incluir plantas, microrganismos e invertebrados? Isto teria sérias implicações para a regulamentação dos pesticidas e biocidas, que são projetados especificamente para atuar nos processos endócrinos de plantas ou pragas, e que possuem potenciais riscos inaceitáveis em organismos não-alvo (KORTENKAMP et al. 2011).

Os DEs, ao entrarem na cadeia alimentar, tendem a se acumular nos indivíduos de maior nível trófico, como os humanos, justamente por serem degradados muito lentamente. Assim, podem não ser metabolizados ou até se transformarem em compostos ainda mais tóxicos. Isso ocorre porque os DEs tendem a ser altamente lipofílicos, o que faz com que se depositem no tecido adiposo, levando à sua bioacumulação (DIAMANTI- KANDARAKIS et al, 2009). Sendo assim, quantidades significativas de DEs podem estar presentes em carnes, peixes, ovos e derivados do leite. Essa contaminação alimentar pode ser justificada pelo uso de hormônios na criação de animais, apesar dessa prática ser proibida em diversos países (BILA e DEZOTTI, 2007).

Estudos recentes demonstraram que ratos expostos ao dietilestilbestrol (DEs) no período neonatal apresentaram aumento do peso corporal com excesso de gordura abdominal na idade adulta, além de elevações nos níveis de adiponectina (hormônio), IL-6 (estimular a resposta imune) e triglicerídeos (HEINDEL, 2003). Quando o organismo passa a sofrer a ação dos estrogênios ambientais (EA), ocorre uma modulação direta da lipogênese, da lipólise ou da adipogênese, com impacto direto sobre a obesidade. Além disso, os EA atuam indiretamente no sistema nervoso central (SNC) e no fígado, aumentando o consumo alimentar, reduzindo a secreção de leptina e a homeostase hepática dos lipídeos (JUNIOR e FERNANDES, 2009).

Alguns estudos vêm demonstrando que DEs têm sido referidos como agentes etiológicos de feminilização e de vários tipos de cânceres em seres humanos e na fauna animal (SHARPE, 2001; DAMGAARD et al., 2002; THORPE et al., 2003; JENSEN et al., 2004; GUIMARÃES e DUARTE, 2007; STAVRAKAKIS et al., 2008).

Os hormônios podem atingir também os corpos d'água por meio de escoamento superficial em áreas onde existam excretas de animais ou foi aplicado biossólido no solo (LEE et al., 2003). Como uma concentração muito baixa, 10 ngL^{-1}

de hormônio, pode causar efeitos biológicos adversos em organismos aquáticos (BAREL-COHEN et al., 2006), a solubilidade apresentada na Tabela 6, pode ser considerada muito alta.

Tabela 6 - Solubilidade e pressão de vapor dos estrogênios.

Estrogênios	Pressão de Vapor (Pa)	Solubilidade em água (mg/L)
Estradiol	$3,0 \cdot 10^{-8}$	13
Estrona	$3,0 \cdot 10^{-8}$	13
Estriol	$9,0 \cdot 10^{-13}$	13
17 α -Ethinilestradiol	$6,0 \cdot 10^{-9}$	4,8

Fonte: LAI et al. (2000)

Em testes de laboratório, os efeitos sobre sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e reprodução de espécies individuais são geralmente considerados como ecologicamente relevantes para a manutenção das populações selvagens (KORTENKAMP et al. 2011). No entanto, se for considerada a proteção ou valorização da biodiversidade, um efeito adverso precisa ser demonstrado não em organismos individuais, mas em uma população. Isso levanta a questão de como o conceito de adversidade deve ser interpretado em um contexto ecológico.

3.1.4 Estrogênios

Atualmente há uma preocupação com o monitoramento dos hormônios sexuais, notadamente os estrogênios, presentes em efluentes de esgoto doméstico, compostos extremamente ativos biologicamente, e com potencial de agir como desreguladores endócrinos.

Os hormônios sexuais são classificados em três grupos principais: (I) estrogênios, que são hormônios sexuais femininos, (II) andrógenos, que são hormônios sexuais masculinos, e (III) progestógenos, que são hormônios da gravidez (SOLOMONS et al, 2000).

Os estrogênios são hormônios femininos produzidos a partir da adolescência, período que aparecem os primeiros sinais sexuais secundários na mulher, e a produção é encerrada na menopausa. As principais funções no organismo feminino são: características femininas ao corpo, voz fina e seios; desenvolvimento de órgãos

sexuais; ciclos menstruais; formação de tecido ósseo; manutenção do metabolismo e proteção cardiovascular.

Os estrogênios naturais como a estrona (E1), o 17β -estradiol ou estradiol (E2) e o estriol (E3), são diariamente produzidos e excretados pelas mulheres e animais vertebrados fêmeas via urina e fezes (RIBEIRO et al., 2010). Dentre os estrogênios naturais o E2 é mais ativo que a E1 e E3, que são estrogênios derivados do E2. O 17α -etinilestradiol ou etinilestradiol (EE2) é um estrogênio sintético usado em pílulas anticoncepcionais e apresenta maior atividade que os hormônios naturais, sendo também excretado diariamente pelas mulheres que fazem o seu uso. Na Figura 4 são demonstradas as estruturas químicas dos estrogênios.

Figura 4. Estruturas químicas dos estrogênios: (a) estrona – E1; (b) estradiol – E2; (c) estriol – E3; (d) etinilestradiol – EE2.

Svenson et al. (2003) estimaram, a partir de ensaios *in vitro*, a atividade estrogênica da E1, do E3 e do EE2 em relação à atividade do E2 (Tabela 7).

Tabela 7 - Excreção humana per capita de estrogênios ($\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$) e estrogenicidade relativa ao estradiol.

Categoria	Naturais			Sintético
	Estrona	17 β -estradiol	Estriol	17 α -etinilestradiol
Mulheres menstruando ⁽¹⁾	8,0	3,5	4,8	*
Mulheres grávidas ⁽¹⁾	600,0	259,0	6000	*
Mulheres na menopausa ⁽¹⁾	4,0	2,3	1,0	*
Mulheres usando pílulas anticoncepcionais ⁽¹⁾	*	*	*	35,0
Homens ⁽¹⁾	3,9	1,6	1,5	*
Estrogenicidade relativa ⁽²⁾	0,1900	1,0000	0,0036	2,3000

Nota: * : não aplicável. Fonte: (1) Johnson et al. (2000); (2) Svenson et al. (2003).

Os hormônios são excretados na forma conjugada, mas há estudos que demonstram que eles também são encontrados na forma livre em esgotos, sendo desconjugados pela enzima β -glucuronidase produzida pela bactéria *Escherichia coli* (D'ASCENZO et al, 2003).

3.1.5 Remoção de micro contaminantes em ETE

Em particular, efluentes oriundos de ETE aparentam ser a maior fonte de liberação de compostos estrogênicos em rios, córregos e águas superficiais, mostrando que a eficiência do tratamento, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, é apenas parcial (JOHNSON et al., 2001; KORNER et al., 2001; LEE et al., 2008; TERNES et al., 2002; CLARA et al, 2004; ZORITA et al. 2009).

Para entender a remoção dos fármacos e DE em uma ETE, devem ser avaliados os mecanismos envolvidos no processo de remoção. Esses mecanismos são definidos pelas propriedades físico-químicas das moléculas dos microcontaminantes, pelas configurações dos sistemas de tratamento, pelas condições ambientais e pelos parâmetros operacionais aplicados ao sistema de tratamento (VIRKUTYTE et al., 2010).

Os possíveis mecanismos de remoção são: sorção, biodegradação, transformações químicas, fotodegradação e volatilização (CALIMAN e GAVRILESCU, 2009).

Embora a remoção de estrogênio em sistemas de lodos ativados seja um processo complicado que inclui clivagem de conjugados, sorção e biodegradação, a diminuição da concentração é principalmente devido à biodegradação (ANDERSEN et al, 2003,; Li et al, 2004). Segundo Stavrakakis et al. (2008), o 17 β -estradiol (E2) apresenta diferentes comportamentos em uma ETE e no ambiente aquático. Por esse fato, salienta-se a importância de novos estudos sobre a degradabilidade desse composto tão comumente encontrado em ETEs.

Com relação ao destino de DE em ETEs, Richardson e Bowron (1985) citam três possíveis destinos: a) pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água como, por exemplo, o ácido acetilsalicílico; b) pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como as penicilinas; e c) pode ser persistente como o clofibrato, que é um antilipêmico.

Os estrogênios, excretados principalmente como conjugados inativos de ácido sulfônicos e glucurônicos, são clivados em esteróides estrogênicos ativos durante os processos de tratamento de esgoto, sendo lançado no ambiente (PURDON et al., 1994).

Dentre os fatores que podem interferir na remoção de desreguladores endócrinos nas unidades de tratamento de esgoto estão: o tipo de tratamento, concentração de sólidos no esgoto, temperatura, tempo de retenção dos sólidos e tempo de detenção hidráulica (VIENO et al., 2007).

De acordo com Stumpe e Marschner (2007) e Ternes et al., (1999), a remoção do E2 em sistemas de tratamento está intimamente relacionada com a rápida biodegradação do E2 resultando em estriol (E1) durante o tratamento secundário. No entanto, sob condições anaeróbias a biodegradação de E2 é limitada. Esta recalcitrância dos estrogênios teria enormes implicações para o ambiente, porque as áreas anóxicas poderiam se tornar repositórias para estas substâncias químicas e potencialmente se tornar uma futura fonte de estrogênios na água sempre que o sistema é interrompido (CZAJKA e LONDRY, 2006).

Alguns autores mostram que a degradação de estrogênios sob condições anaeróbias é significativamente mais lenta do que sob condições aeróbias (CZAJKA e LONDRY, 2006; LEE e LIU, 2002; REN et al., 2007).

LEE et al. (2004), em estudo realizado em Toronto, Canadá, encontraram concentrações de E2 variando de 8,7 a 26 ng / L (média de 15 ng / L) e <1 a 7,4 ng / L (média de 2,7 ng / L) no afluente e efluente, respectivamente. Segundo os autores,

a remoção do E2 no sistema de tratamento está relacionada com a rápida biodegradação do E2 resultando no metabólito estriol (E1) sob condições aeróbias durante o tratamento secundário, como também relacionaram outros autores (TERNES et al., 1999; LEE e LIU, 2002). Aumentos similares nos níveis de E1 durante processos aeróbios de tratamento de esgoto também foram encontrados (BARONTI et al., 2000; SERVOS et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2007), como exemplifica a Tabela 8 (HASHIMOTO e MURAKAMI, 2009).

Tabela 8 - Concentração de estrogênios e eficiência de remoção em estações de tratamento de esgoto.

ETEs	Afluente (ng l ⁻¹)		Efluente (ng l ⁻¹)		Eficiência de Remoção (%)	
	E2	E1	E2	E1	E2	E1
ETE1	11	66	1.9	80	83	-21
ETE2	12	68	<0.5	22	98	68
ETE3	8.9	21	<0.5	9.0	97	57
ETE4	5.8	40	<0.5	0.6	95	99

Fonte: HASHIMOTO e MURAKAMI (2009).

Baronti e colaboradores (2000) demonstraram que um processo de lodos ativados de uma ETE na Itália removeu 95% de estriol, 87% de 17 β -estradiol, 85% de 17 α -etinilestradiol e apenas 61% de estrona. Segundo Johnson e Sumpter (2001), os processos de lodos ativados removem em torno de 85% de 17 β -estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol e em menor porcentagem o estrona.

O E2 parece ser facilmente tratado por sistemas de tratamento aeróbios secundários, mas grandes diferenças foram observadas entre a ETEs com eficiência de remoção de 62% a 98% (LEE et al., 2004; STAVRAKAKIS et al., 2008). Além disso, alguns estudos têm mostrado concentrações de até 37 ng g⁻¹ no lodo de esgoto, mostrando que a adsorção é uma etapa importante na remoção de DE juntamente com a biodegradação (TERNES et al., 1999).

Hernandez-Raquet et al. (2007) analisaram a remoção do E2 em lodo de esgoto em sistemas de tratamentos e não observaram redução da atividade estrogênica no tratamento anaeróbio, enquanto que o tratamento aeróbio e o pós-tratamento apresentaram menos de 10% do estrogênios presentes no lodo antes do tratamento.

Foram relatados vários estudos de monitoramento sobre a eficiência de remoção de estrogênios em ETE no mundo (Tabela 9). A gama de concentrações de estrogênios relatados nos afluentes de ETE é 7,3 e 197 ng/L (E1), 4,9 e 48 ng/L (E2) e (<0,2) e (<11) ng/L (EE2), as quais são removidas nas ETE com taxas de remoção 10 e 100 % para E1, 39,6 e 100 % para E2, e 0 e >98% para o EE2. A média é de 78 % (E1), 89 % (E2) e de 74 % (EE2).

Tabela 9 - Remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgoto no mundo.

País da ETE	P.E.*	Concentração afluente (ng/L)			Concentração efluente (ng/L)			Taxa de remoção (%)			Referências
		E1	E2	EE2	E1	E2	EE2	E1	E2	EE2	
Suíça	55.000	24	7.6	4.3	2.4	<0,5	<0.5	90	>93	>88	1
	60.000	7.3	4.9	0.7	8.6	1.0	<0.5		80	>29	
Alemanha	300.000	74.9	10.9	5.2	<1	<1.0	<1	>99	>91	>81	1
	312.000	27	152	2.4	25	5.4	2.4	10	64	0	4 e 6
Canadá	68.800							66.7	82.9		2
	124.000							72.7	96.8		
	1.226.000							-	39.6		
	46.000							76.7	92.7		
	24.800							85.4	98.3		
	179.300							-	75.9		
	3.600							96.5	93.3		
	29.000							97.8	98.8		
	10.000							95.1	98.2		
	600.000							82.1	94.7		
	382.000							80.6	96.1		
	157.000							95.1	97.1		
Japão	709.000	113	20.6		18.2	3.19		83.9	84.5		3
	709.000	197	25.8		30.8	2.54		84.3	90.1		
	764.000	28.7	22.9		2.8	0.49		90.3	97.9		
	58.400	66	11		80	1.9		-	83		13
	16.200	68	12		22	<0.5		68	98		
	2.000	21	8.9		9.0	<0.5		57	97		
	2.900	40	5.8		0.6	<0.5		99	95		
Holanda	284.400	11		<0.5	2.7		<0.5	75		-	
	284.400	42	14	<1.4	15	1.1	<1.4	64	92	-	4 e 5
	231.000	18		<0.2	<0.4		<0.2	>98		-	
	231.000	100	31	<1.4	6.3	0.7	<1.8	94	98	-	
	296.400	87	9	88.8	2.1	<0.6	<0.2	98	>94	>9	
	296.400	140	48	1.3	47	12	<0.3	66	75	>7	

Brasil	624.000	40	21	4.2	6.8	<0.4	0.9	83	99	78	4 e 6
Austrália	>3.000	54.8	22.0	<5.0	8.1	0.95	<0.1	85	96	-	7
Canadá								100	100		8
								83	100		
								82	100		
								50	100		
								80	100		
Itália	40.000	71	16.1	3.9	9.6	1.5	0.4	86.0	88.9	87.2	9
	800.000	50.4	9.3	2.3	7.7	0.8	0.4	83.8	91.5	85.8	
	120.000	67	9.2	3.4	41	0.9	0.5	93.9	87.6	84.3	
	800.000	36.8	11.5	3.0	13.9	1.0	0.4	64.3	91.7	87.1	
	1.200.000	35.2	8.6	2.9	30.3	1.9	0.5	18.8	76.2	82.9	
	350.000	50.6	14.7	2.5	44.6	2.4	0.5	22.1	83.6	84.9	10
Suécia	150.000	14.5	3.2	<10	3	<1.6	<10	79.3	>50	-	11
Espanha	420.000	<130		<11	<0.6		<11	99		-	
USA	650.000				3 ~6	<2	<2				12

1 - JOSS et al., 2004; 2 -SERVOS et al., 2005; 3 - NAKADA et al., 2006; 4 -JOHNSON et al., 2000; 5 - BELFROID et al., 1999; 6 - TERNES et al., 1999a; 7 - BRAGA et al., 2005; 8 - LISHMAN et al., 2006; 9 - BARONTI et al., 2000; 10 - ZORITA et al., 2009; 11 - CASES et al., 2011; 12 - NELSON et al., 2011; 13 - HASHIMOTO e MURAKAMI, 2009; *população equivalente

No Brasil, em 1997, alguns autores realizaram o monitoramento de estrogênios no esgoto doméstico da ETE da Penha/RJ, sendo que as taxas de remoção de 17β -estradiol observadas foram de 92% para efluente tratado em filtro biológico e 99,9% para efluente tratado pelo processo de lodos ativados (TERNES et al., 1999).

Como é sabido, a maioria dos DE/PFHP (produtos farmacêuticos e de higiene pessoal) não são completamente removidos em estações de tratamento. As eficiências de remoção são fortemente dependentes do tipo de tratamento aplicado em cada ETE e das propriedades físico-químicas do micropoluentes. Por essas razões, torna-se difícil estabelecer o método mais eficiente para ser usado quando misturas de PFHP/DE estão presentes em águas residuárias. Unidades de pós-tratamento avançadas (ozônio, processos oxidativos avançados, carvão ativado, membranas) podem constituir opções confiáveis para a remoção de DE/PFHP (CALIMAN e GAVRILESCU, 2009).

Segundo levantamento realizado por Snyder et al (2003), os possíveis desempenhos de diferentes processos unitários baseados em relatos obtidos na literatura são demonstrados na Tabela 10, na qual é apresentado resumo do potencial para a remoção de diferentes classes de DEs e PFHPs. As estimativas da eliminação são baseadas na estrutura química (tamanho, hidrofobicidade, e

composição do grupo funcional).

Tabela 10 - Processos de tratamento e operações utilizadas na remoção de DEs, CFAs e PFHPs, e avaliação das eficiências de remoção.

Grupos	Classes	CA	FCAB	O3/ POAs	UV	Cl ₂ /ClO ₂	Coagu- lação/ Flocu- lação	NF	OR	Degra- dação (B/F/LA)
DEs	Químicos industriais	E	E	B-O	E	Ru	Ru-R	E	E	O-E (B)
	Esteroides	E	E	E	E	E	Ru	O	E	R-E (B)
CFAs	Antibióticos	B-O	E	R-E	B-O	Ru-O	Ru-R	E	E	E (B)
	Antidepressivos	O-E	O-E	R-E	B-O		Ru-R	O-E	E	O-E (F)
	Anti-inflamatórios	E	O-E	E	E	Ru-B	Ru	O-E	E	O-E
	Reguladores lipídicos	E	E	R-E	B-O	Ru-B	Ru	O-E	E	E (B)
	Meios de contraste de raios - X	O-E	O-E	R-E	B-O	Ru-B	Ru-R	O-E	E	Ru (B)
	Medicamentos de uso psiquiátrico	O-E	O-E	R-E	B-O	Ru-B	Ru-R	O-E	E	E (B e F)
PCPs	Almíscares sintéticos	O-E	O-E	R-E	B	Ru-B	Ru-R	O-E	E	O-E
	Protetores solares	O-E	O-E	R-E	B-O	Ru-B	Ru-R	O-E	E	E (B)
	Antimicrobianos	O-E	O-E	R-E	B-O	Ru-B	Ru-R	O-E	E	B (F)
	Surfactantes/ detergentes	E	E	B-O	B-O	Ru	Ru-R	E	E	R-E (B)

Fonte: Snyder et al, (2003). Nota: E - Excelente (> 90%); O – ótimo (70-90%); B – bom (40-70%); R - regular (20-40%); Ru – ruim (<20%); PCPs – compostos de higiene pessoal; CFAs – compostos farmacêuticos ativos; CA- Carvão ativado; FCAB – filtro de carvão ativado biológico; POAs-Processos oxidativos avançados; NF- Nanofiltração; OR – Osmose reversa; B – biodegradação; F – Fotodegradação; LA – Lodo ativado.

3.2 Protozoários - *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.*

No mundo, a cada 14 segundos morre uma criança vítima de doenças de veiculação hídrica, sendo que a principal causa é contaminação de águas e poços superficiais através dos esgotos e excrementos humanos (MORAES e JORDÃO, 2002). Estima-se que 80% de todas as enfermidades mais de um terço dos óbitos de países em desenvolvimento sejam causados pelo consumo de água contaminada. As doenças relacionadas à água, tais como: amebíase, febre tifoide e paratifoide e hepatites A e B também trazem impactos diretos na economia, podendo se perder em até um décimo o tempo produtivo de cada pessoa (OMS, 2008).

Os principais microrganismos patogênicos relacionados às doenças de veiculação hídrica são bactérias, vírus e parasitos como: *Burkholderia pseudomallei*,

Campylobacter jejuni, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, adenovírus, astrovírus, Hepatites A e E, rotavírus, *Acanthamoeba* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria fowleri* e *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia intestinalis* (OMS, 2008). Na Tabela 11 estão demonstrados os principais agentes patogênicos presentes na água, suas respectivas doenças, concentrações excretadas e respectivas doses infectantes.

Tabela 11 - Alguns dos principais agentes etiológicos de doenças de veiculação hídrica.

Agentes	Doenças	Concentração excretada/g de fezes	Dose Infectante (nº de organismos)
<i>Salmonella typhi</i> ⁽¹⁾	Febre Tifoide	10 ⁶	10 ⁵ -10 ⁹
<i>Shigella</i> spp. ⁽¹⁾	Disenteria Bacilar	10 ⁶	10 -100
<i>Vibrio cholerae</i> ⁽¹⁾	Cólera	10 ⁶	10 ⁸
<i>Enterovirus</i> ⁽²⁾	Gastroenterite	10 ⁶	<100
Vírus da Hepatite A ⁽²⁾	Gastroenterite	10 ⁶	<100
<i>Giardia lamblia</i> ⁽³⁾	Giardíase	10 ⁵	<10
<i>Cryptosporidium</i> sp ⁽³⁾	Criptosporidiose	10 ⁶	<10
<i>Entamoeba histolytica</i> ⁽³⁾	Amebíase	10 ⁵ -10 ⁷	<100
<i>Ascaris lumbricoides</i> ⁽⁴⁾	Ascaridíase	10 -10 ⁴	<10
<i>Ancylostoma duodenale</i> ⁽⁴⁾	Ancilostomose	10 -100	<10
<i>Taenia</i> ⁽⁴⁾	Teníase	10 ⁵	<10

Adaptado de MEDEIROS, 2013. 1 – Bactéria; 2 - Vírus; 3 - Protozoário; 4 – Helminto.

Entre os vários agentes patogênicos relacionados à veiculação hídrica, algumas das espécies dos protozoários parasitos como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são reconhecidas como causadoras de surtos de diarreia, sendo que nos últimos 25 anos estes organismos alcançaram grande relevância em termos saúde pública devido ao expressivo número de casos registrados (GAJADHAR e FORBES, 2002; MACPHERSON, 2005; KARANIS, 2007; CANTUSIO, 2008).

Na historia da protozoologia parasitária, a *Giardia* spp. tem um lugar especial na ciência porque o parasito *Giardia duodenalis*, também conhecido como *G. lamblia* ou *G. intestinalis* (convencionou-se usar somente *G. intestinalis*), foi o primeiro protozoário parasito de humanos descoberto por Antonie van Leeuwenhoek em 1681 (DOBELL, 1932; KEAN et al. 1978).

Giardia intestinalis é o protozoário intestinal responsável pela giardíase, amplamente distribuída pelo mundo. Da maioria dos indivíduos infectados em particular nas crianças podem causar má absorção, diarreia e dor abdominal (CIMERMAN et al., 1977). *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são os principais causadores de diarreia por protozoários, liderando uma significativa taxa de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (SNEL et al., 2009).

Durante o ciclo evolutivo a *G. lamblia* adquire duas formas morfológicas distintas (Figura 5), a cística no ambiente e a trofozoítica no intestino do hospedeiro (RENDTROFF, 1954). O cisto é a forma infecciosa, que pode permanecer viável na superfície da água por aproximadamente dois meses (De RENDTROFF et al., 1989) e é transmitida ao homem pela ingestão de água e alimentos contaminados com material fecal (THOMPSON et al., 1993).

Figura 5. As formas trofozoítica (a) e cística (b) da *Giardia* spp. durante seu ciclo.

Fonte: Ankarklev et al. (2010).

A primeira descrição morfológica detalhada do parasito foi feita por Lambl em 1859 que designou-a de *Cercomonas intestinalis*. Nos anos seguintes diferentes nomenclaturas foram propostas, tais como: *Dimorphus muris*, sugerida por Grassi em 1879 quando observou a sua presença em roedores; *Giardia* spp., designada pela primeira vez por Kunstler; e *Lamblia intestinalis*, *G. duodenalis*, *G. lamblia* e *G. entérica*, nomenclaturas dadas nos anos seguintes (Adam, 2001). Todavia, a nomenclatura atualmente aceita é *G. duodenalis*.

Atualmente seis espécies de *Giardia*. e 30 *Cryptosporidium*. são aceitas pela

comunidade científica (FENG e XIAO, 2011; PLUTZER et al., 2010; VILLARROEL, 2013; SLAPETA, 2013). Essas espécies estão relacionadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* e seus principais hospedeiros.

Gênero	Espécies	Hospedeiros
<i>Giardia</i> spp.	<i>G. duodenalis</i>	Humanos, Macacos, bovinos, cães, equinos e outros mamíferos.
	<i>G. agilis</i>	Anfíbios
	<i>G. ardeae</i>	Aves
	<i>G. microti</i>	Roedores
	<i>G. muris</i>	Roedores
	<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>C. muris</i>	Roedores
	<i>C. parvum</i>	Gado, animais domésticos, homem.
	<i>C. meleagridis</i>	Aves
	<i>C. wrairi</i>	Porcos da Guiné
	<i>C. agni</i>	Ovelha
	<i>C. bovis</i>	Gado
	<i>C. cuniculus</i>	Coelho
	<i>C. felis</i>	Gatos
	<i>C. serpentis</i>	Répteis
	<i>C. nasoris</i>	Peixes
	<i>C. baileyi</i>	Aves domésticas
	<i>C. varanii</i>	Lagartos
	<i>C. cichlidis</i>	Peixes
	<i>C. reichenbachklinkei</i>	Peixes
	<i>C. galli</i>	Aves
	<i>C. andersoni</i>	Gado
	<i>C. canis</i>	Cães
	<i>C. hominis</i>	Homem
	<i>C. molnari</i>	Peixes
	<i>C. suis</i>	Porcos
	<i>C. scophthalmi</i>	Peixes
	<i>C. pestis</i>	Gado, homem e outros mamíferos
	<i>C. fayeri</i>	Marsupiais
	<i>C. ryanae</i>	Gado
	<i>C. fragile</i>	Anfíbios
	<i>C. macropodum</i>	Marsupiais
	<i>C. ducismarci</i>	Tartarugas
	<i>C. ubiquitum</i>	Mamíferos, incluindo o homem
	<i>C. viatorum</i>	Homem
	<i>C. scrofarum</i>	Porcos domésticos e javalis

Adaptado de Medeiros (2013).

O cisto da *Giardia* spp. possui formato oval variando de 8 a 12 μm de comprimento, por 7 a 10 μm de largura. Sua “parede” tem de 0,3 a 0,5 μm de espessura, possuindo dois ou quatro núcleos (USEPA, 2005; ADAM, 2001). Já o gênero *Cryptosporidium* foi descoberto pelo parasitologista Ernest Edward Tyzzer em 1907. A maioria dos oocistos possui forma esférica variando de 4 a 6 μm de diâmetro (TZIPORI e WIDMER, 2008).

O ciclo de vida da *Giardia* spp. (Figura 6) inicia-se com a contaminação por água ou alimentos contaminados. Os cistos ao passarem pelo estômago se rompem, dando origem às formas trofozoítas. Os trofozoítas ao passarem pelo estômago sofrem divisão binária e chegam ao duodeno, onde ficam livres ou aderidos à mucosa intestinal por mecanismo de sucção. Estes possuem proteínas de adesão às células intestinais que não deixam que sejam arrastados com as fezes. A formação dos cistos ocorre quando o parasito transita o cólon, e neste se misturam às fezes. No intestino multiplicam-se assexuadamente por divisão binária. No exterior, os cistos resistem de semanas a meses até serem ingeridos novamente.

Figura 6. Ciclo de *Giardia* spp. (figura da esquerda) e de *Cryptosporidium* spp. (figura da direita) no hospedeiro humano. Adaptado por Bastos et al. (2003) de Centers for DiEse Control and Prevention (CDC).

A disseminação da *G. intestinalis* deve estar condicionada, em linhas gerais, aos seguintes fatores epidemiológicos: água de beber e de uso doméstico; alimentos servidos frios, como leite e refrescos; alimentos crus, como saladas e frutas; contato com manipuladores de alimentos; contato direto pessoa a pessoa; ou como consequência de fezes expostas e contato indireto por artrópodes domésticos, principalmente baratas e moscas (COUTINHO, 1960). As contaminações humanas com *G. intestinalis* são comuns e incidem, principalmente, em crianças com faixa etária de 0 a 5 anos. Isso se deve aos precários hábitos higiênicos desta faixa etária ou à ausência de imunidade à reinfecções (STANLEY e MEYER, 1984).

No ciclo da criptosporidíase (Figura 6), os oocistos são ingeridos pelo homem através da água e dos alimentos contaminados. No intestino, os esporozoítos infectantes penetram nos enterócitos e desenvolvem-se por esquizogonia (ciclo assexuado) gerando merozoítos. Estes podem realizar mais ciclos esquizogônicos ou passar para gametogonia (ciclo sexuado) levando à produção de oocistos, que são então eliminados nas fezes, contaminando o ambiente. (BARROS et. al, 2005). Após uma série de replicações assexuadas, uma pequena proporção dos parasitos se diferencia em estágios sexuais, resultando na produção de micro e macro gametas que eventualmente se fundem para formar zigotos e novos oocistos. Dois tipos de oocistos são produzidos: oocistos com parede espessa, que são as formas de infecção encontradas no ambiente, e oocistos de parede fina, que são causa de autoinfecção (CACCIO, 2004).

As formas infectantes destes protozoários patogênicos são liberadas via fezes dos hospedeiros infectados, fazendo com que o esgoto doméstico seja uma das mais importantes fontes de contaminação ambiental com grande impacto na saúde pública (MACPHERSON, 2005; MONTEMAYOR et al., 2005).

Entre os vários grupos de organismos patogênicos que podem causar gastroenterite no homem, estão os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., os quais têm sido frequentemente detectados em amostras ambientais em todo o mundo, inclusive no Brasil (FRANCO et al., 2001; HACHICH et al., 2004, SANTOS et al., 2004; CANTUSIO-NETO et al., 2006; LEAL et al., 2008). Estima-se que 20% da população mundial esteja parasitada com *Giardia* spp. (ROCKWELL, 2007). O *Cryptosporidium* spp. é apontado como um dos principais agentes causadores de diarreia em crianças (ROSE et al., 2002), sendo particularmente preocupante em indivíduos imunocomprometidos, nos quais a taxa de mortalidade muda de 0,001%

para aproximadamente 60% (BOULTER-BITZER et al., 2007).

No final dos anos 1980, os protozoários parasitos *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. destacaram-se como os principais contaminantes associados à veiculação hídrica: ao mínimo 325 surtos epidêmicos associados aos protozoários parasitos e transmitidos pela água já foram noticiados no globo (FRANCO, 2007; KARANIS et al., 2007). Alguns estudos evidenciam que o esgoto doméstico foi a principal fonte de contaminação dos mananciais em surtos de doenças de veiculação hídrica (MACPHERSON, 2005; AIYUK et al., 2006; OTTOSON et al., 2006; LI et al., 2009).

No Brasil, a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. é relatada em amostras de água superficial e de esgoto, bruto e tratado, sendo frequentemente detectados numa ampla faixa de concentração (DIAS JÚNIOR 1999; FARIAS et al., 2002; HACHICH et al., 2004; CANTUSIO-NETO et al., 2010).

A Portaria M/S n. 2914, de 12/12/2011, recomenda que quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100 mL deve-se realizar monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas formas ambientais com o objetivo de assegurar a adequada eficiência de remoção na água a ser distribuída para a população.

Ainda que a presença de protozoários em águas para consumo humano revele-se como um importante problema de saúde pública em diversos países, as pesquisas sobre esses riscos ainda são escassas no Brasil (HELLER et al., 2004). A inexistência de dados devidamente documentados e comprovados sobre a ocorrência de surtos de giardíase e de criptosporidíase de transmissão hídrica no país mostrou a necessidade da implantação e otimização dos métodos de detecção e quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e esgoto (FRANCO, 2007). É interessante ressaltar que a pesquisa de cistos e oocistos em águas é difícil, as técnicas atuais ainda estão sujeitas à grande variabilidade e baixa reprodutibilidade, proporcionalmente ao aumento da turbidez, e representam um alto custo frente aos métodos usados para medir outras variáveis de qualidade de água (ATHERHOLT et al., 1998).

Os surtos descritos até hoje no Brasil referem-se a episódios entre crianças frequentadoras de creches, decorrentes da transmissão por contato interpessoal. Entretanto, a demanda da saúde pública pela implantação de pesquisa dos

protozoários patogênicos é real no país, haja vista o período de 1999 a 2001, quando surtos epidêmicos de ciclosporoze e de toxoplasmose, de transmissão pela água distribuída à população ocorreram nos estados de São Paulo e Paraná atingindo aproximadamente 1.075 pessoas (FRANCO, 2007).

Giardia spp. e *Cryptosporidium* spp. são organismos reconhecidamente resistentes à cloração, sendo a eficiência da inativação por desinfecção ainda é pouco conhecida (LeCHEVALLIER et al., 1995). Entretanto, dada às respectivas medidas dos cistos e oocistos (4 a 12 µm), pode-se assegurar que são significativamente removidos por sistemas filtração (Tabela 13). Entretanto, durante a filtração, a compressibilidade exibida pelos oocistos de *Cryptosporidium* permite que essas formas de resistência passem a se comportar como uma partícula de 2 a 4 micrometros (HSU e YEH, 2003; CARET et al., 2004). Desse modo, um pequeno número de oocistos pode chegar à água tratada e, por essa via, propagar-se aos consumidores. Dentre os principais processos de remoção de microrganismos patogênicos, o uso de sistemas de filtração lenta é a que há mais de 100 anos vem se destacando em reduzir os riscos microbiológicos. Dois dos primeiros casos de sucesso foram reduções de cólera em Altona (Alemanha) e febre tifóide em Lawrence (EUA) na década de 1890 (BELLAMY et al., 1985).

Tabela 13 - Eficiência de remoção de cisto e oocistos em sistemas de filtração.

Sistema de filtração	Turbidez do efluente (UNT)	Log/percentual de remoção (%)	Referências
Filtração rápida	≤ 0,5	3,0 log ₁₀ (99,9%) ^A	ONGERTH (1990)
Filtração lenta	≤ 1,0	3,0 log ₁₀ (99,9%) ^A	NIEMINSKI et al. (1995)
Filtração lenta	≤ 1,0	2,0 Log ₁₀ (99%) ^B	USEPA (1998)
Filtração rápida	≤ 0,3	2,0 Log ₁₀ (99%) ^B	ONGERTH (1995)

A- cisto de *Giardia* spp.; B – oocisto de *Cryptosporidium* spp.

Para a aceitação de grau de risco aceitável nos EUA (uma infecção anual para cada 10.000 habitantes) as concentrações máximas de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. devem ser, respectivamente, de 7x10⁻⁶ cistos/ L e 3x10⁻⁵ oocistos/L, o que é, obviamente, de difícil detecção.

Desta maneira, a partir dos comentários mencionados torna-se importante o estudo aprofundado sobre os microcontaminantes e microrganismos patogênicos

nas estações de tratamento de esgoto sanitário. As metodologias utilizadas para o estudo estão descritas a seguir.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Localização do Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

As instalações da pesquisa foram montadas na estação de tratamento de esgoto (ETE) do campus da Universidade de São Paulo em São Carlos-SP, com coordenadas geográficas 22° 0' de latitude Sul, 47° 53' de longitude oeste e aproximadamente 856 metros de Altitude. O clima é temperado de altitude, apresenta verão chuvoso com inverno seco no sistema Koppen e temperatura média mínima de 15,3° e máxima de 27,0°. O índice pluviométrico médio anual é de 1512 mm.

A ETE (Figura 7) recebe todo o esgoto produzido no campus universitário.

Figura 7. Estação de tratamento de esgoto do campus da USP São Carlos.

4.2 Descrição e monitoramento do sistema de tratamento de esgoto

Atualmente a ETE possui tratamento preliminar, seguido de reator de leito expandido (atualmente inoperante) e reator UASB em escala piloto. O resíduo bruto que chega à estação é submetido a gradeamento inicial para a separação das detritos maiores. Separados os resíduos e objetos mais grosseiros, o efluente segue

para os desarenadores, cuja função é separar a areia do líquido que seguirá para a caixa de remoção de gordura.

Após a fase preliminar o efluente é bombeado para o tanque “pulmão” e escoado por gravidade para um tanque no qual é bombeado para o reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), denominado de Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e de Manta de Lodo. O reator UASB utilizado na pesquisa, objeto de várias pesquisas realizadas na EESC/USP, tem uma eficiência média esperada de 70% em termos de remoção de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio). Ao passar pelo reator UASB o efluente é bombeado para o sistema de lodo ativado.

As dimensões do reator UASB em formato cilíndrico são 0,8 m de diâmetro e 3,0 m de altura útil, perfazendo volume total de $1,5 \text{ m}^3$. A vazão afluyente ao reator UASB foi ajustada em 125 L/h, o que resulta em tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 horas (Figura 8).

Figura 8. UASB cilíndrico projetado.

Figura 9. Reator anaeróbio tipo UASB (PASSIG e CAMPOS, 2005).

No início das pesquisas o reator UASB utilizado tinha dimensões de 2,0 m de lado e 4,7 m de altura útil, perfazendo volume total de $18,8 \text{ m}^3$. No entanto, a vazão afluyente ao reator UASB foi ajustada em $1,5 \text{ m}^3/\text{h}$, o que resulta em tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 horas (Figura 8).

O sistema de lodo ativado com ausência do decantador primário tem as dimensões de 0,9 m x 0,9 m e 1,6 m de altura útil, com um volume 1,26 m³ (Figura 9). A operação do reator foi em escoamento contínuo e a aeração era feita por ar proveniente de compressor e difusão por membrana. O decantador secundário foi confeccionado com dimensões de 0,20 x 0,40 m de lado e altura útil de 1,5 m (Figura 10). O volume útil era aproximadamente de 1,25 m³. Para o decantador utilizou-se TDH de 2 horas, taxa de sedimentação de 20 m/dia e vazão de recirculação de 25 L/h.

Figura 10. Decantador do sistema de lodos ativados

No início da operação do sistema foi inoculado 200 litros de lodo, proveniente de outro sistema de lodos ativados, no tanque de aeração. O sistema foi mantido aerado por 24 horas, sem entrada ou saída de esgoto. Após esse tempo, os registros de entrada do efluente do reator UASB e saída foram abertos e a bomba de recirculação ligada. Durante a estabilização os parâmetros monitorados foram pH, oxigênio dissolvido no tanque de aeração, alcalinidade, condutividade elétrica, demanda química de oxigênio e série de sólidos, afim de detectar as fração ideais para a estabilização do sistema.

Após algumas semanas de estabilização do sistema foi colocado um anteparo (placa de aço) na entrada do efluente do tanque de aeração no decantador, que penetrava aproximadamente 60 cm de profundidade, para diminuir o curto-circuito e permitir uma melhor distribuição na entrada do efluente no decantador e melhor sedimentação do lodo.

O tempo de detenção hidráulica e a idade do lodo foram fixados em 20 h (vazão afluente de 70 L/hora) e 20 dias, respectivamente. E numa segunda etapa o TDH se manteve e a idade do lodo foi estabilizada em 8 dias.

O sistema de lodos ativados foi operado com dois tempos de retenção celular (TRC): próximos a 7 e 20 dias. Para isso, houve recirculação do lodo sedimentado no decantador para o tanque de aeração e descarte de lodo excedente diretamente do tanque de aeração.

Os descartes foram realizados manualmente da seguinte forma:

- Para TRC de 7 dias eram descartados diariamente $1/7$ do volume do tanque de aeração. No entanto, como o volume de descarte era grande, foi realizado duas vezes ao dia - pela manhã e final da tarde – afim de totalizar o volume necessário de descarte.
- Para TRC de 20 dias eram descartados $1/20$ do volume em apenas um descarte.

Após o decantador, o esgoto foi armazenado em um tanque do qual era bombeado para o filtro de areia de areia. Este foi proposto como pós-tratamento do efluente secundário advindo dos lodos ativados e possuía formato circular, com 200 mm de diâmetro, como representado na figura 11.

Figura 11. Sistema de Lodos Ativados e Filtro de areia em escala piloto. Nota: A: Tanque de aeração; B: decantador; C Tanque de armazenamento; D: Filtro de areia.

O filtro de areia tinha um fundo falso com 14 cm de altura, separado por placa perfurada. Acima dessa placa foram acrescentados: pedregulho e areias grossa e fina, como pode ser visualizado na Figura 12.

O fundo do filtro, com altura de 18 cm, foi dividido em três camadas de acordo

com o tamanho do pedregulho: Camada Inferior - 12,7 a 19,1 mm; Camada intermediária - 6,0 a 12,0 mm; e Camada superior - 3,0 a 6,0 mm (Figura 12).

Após a camada de pedregulho foi acrescida a camada de areia com 0,8 cm de altura, cuja característica granulométrica está apresentada na Tabela 14.

Figura 12. Montagem do filtro de areia em diferentes camadas de pedregulhos.

Foram destinados 15 cm acima do leito de areia para a manutenção da carga hidráulica a fim de proteger a camada biológica – Schmutzdecke – de forças de cisalhamento causadas pela vazão de entrada do afluente. Antes de iniciar a operação do filtro foi realizado o enchimento com água no sentido ascendente a uma velocidade de $1,0 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$. A taxa de filtração aplicada foi de $4,0 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$. As características da areia utilizada no filtro lento foram: diâmetro efetivo 1,2 mm; coeficiente de uniformidade 1,28 mm e diâmetro variando entre 0,425 a 2,36 mm (Tabela 14).

O tratamento físico-químico se deu pelos processos de coagulação/floculação/sedimentação realizados em batelada em equipamento jar-teste apenas nos efluente do reator UASB e do Sistema de Lodos Ativados. Nessa fase, após receber o coagulante no processo de coagulação em mistura rápida, o efluente permaneceu no jarro na fase de floculação, em mistura lenta, visando a formação dos flocos. Em seguida, a agitação foi interrompida e teve-se início a fase de sedimentação dos flocos, formados para posterior coleta das amostras em um tempo de sedimentação pré-definido (velocidade de sedimentação). Os procedimentos estão melhor detalhados em Oliveira (2012).

Tabela 14 - Ensaio granulométrico da areia do filtro de areia.

Abertura da malha da peneira (mm)	Resultado (%)	Acumulada (%)
2,36	0,0	0,0
2,0	1,2	1,2
1,7	14,2	15,4
1,4	42,8	58,2
1,18	34,8	93,0
1,0	5,6	98,6
0,85	0,8	99,4
0,6	0,6	100,0
0,425	0,0	100,0

Em todos os ensaios físico-químicos foram fixadas as condições de mistura rápida (GMR e T_{MR}) e floculação (G_F e T_F) de modo que não foram realizados ensaios visando à otimização destas condições, uma vez que este não era o foco da pesquisa. Os parâmetros de mistura rápida e floculação utilizados em todos os ensaios de tratamento físico-químico estão apresentados no capítulo de resultados e discussões.

O sistema de desinfecção foi realizado por tanque de contato com o tempo de 15 minutos. A faixa de dosagem utilizada foi definida em função do residual de cloro livre a ser mantido no efluente final e do número máximo de organismos indicadores desejados (coliformes totais e *E.coli*).

Sabe-se que as dosagens de cloro requeridas para a desinfecção dependem de uma série de fatores, notadamente das características do esgoto. Nesse sentido, foram desenvolvidos estudos para determinar as concentrações ideais de cloro a fim de atingir uma determinada eficiência de desinfecção.

O tratamento está simplificado em fluxograma na Figura 13.

Figura 13. Fluxograma geral dos processos de tratamento proposto

4.3 Parâmetros avaliados

O monitoramento e as coletas de amostras foram realizados ao longo de um ano e meio de pesquisa. As diferentes amostras de afluentes/efluentes foram submetidas à análise de diferentes variáveis, conforme apresentado na Tabela 15. As análises físico-químicas e biológicas foram analisadas de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2009), exceto para os parâmetros Cistos de *Giardia* spp. e Oocistos de *Cryptosporidium* spp. adaptados da USEPA (2012).

As análises da pesquisa foram realizadas no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Água - LATAR, da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.

Tabela 15 - Parâmetros, metodologias e frequências amostrais que foram utilizadas para determinação das amostras de esgoto.

Parâmetros	Metodologia	Frequência de análise	Local de Análise
pH	4500 B	Diariamente	LATAR
Temperatura	2550 B	Diariamente	LATAR
Cor aparente	2120 C	Semanalmente	LATAR
Alcalinidade	2320 B	Semanalmente	LATAR
Turbidez	2130 B	Semanalmente	LATAR
COD			
Dureza	2340 C	Quinzenalmente	LATAR
CE ¹	2510 B	Diariamente	LATAR
OD ²	4500-O G	Diariamente	LATAR
DBO ₅ ³	5210 B	Mensalmente	LATAR
DQO ⁴ (demanda química de oxigênio)	5220 D	Semanalmente	LATAR
Coliformes totais	9222 B	Quinzenalmente	LATAR
<i>Escherichia coli</i>	9222 D	Quinzenalmente	LATAR
ST ⁵	2540 B	Semanalmente	LATAR
STV ⁶	2540 E	Semanalmente	LATAR
STF ⁷	2540 B	Semanalmente	LATAR
SST ⁸	2540 B	Semanalmente	LATAR
SSV ⁹	2540 E	Semanalmente	LATAR
SSF ¹⁰	2540 B	Semanalmente	LATAR
Nitrogênio total	4500-N C	Quinzenalmente	Lab. Saneamento
Fósforo total	4500-P E e F	Quinzenalmente	Lab.

			Saneamento
B, Al, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, Ni e Pb	3120 B	Bimestralmente	Lab. Saneamento
Na e K	3500-Na B e 3500-K B	Bimestralmente	Lab. Saneamento
Cloro residual total, livre e combinado	4500-Cl G	Semanalmente	LATAR
	6232 B	Semanalmente	LATAR
	6251 B	Semanalmente	LATAR
Estrogenicidade	Teste YES	Semanalmente	LATAR

Nota: 1. Condutividade elétrica; 2. Oxigênio dissolvido; 3. Demanda bioquímica de oxigênio; 4. Demanda química de oxigênio; 5. Sólidos totais; 6. Sólidos totais voláteis; 7. sólidos totais fixos; 8. Sólidos suspensos totais; 9. Sólidos suspenso voláteis; 10. Sólidos suspensos fixos;

4.4 Metodologia para avaliação da estrogenicidade em amostras de esgoto

A metodologia de análise utilizada no ensaio *in vitro* YES (Yeast Estrogen Screen) foi desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996) e adaptada por Bila (2005). As etapas principais serão descritas nos tópicos a seguir.

Filtragem das amostras de esgoto

Anteriormente à Extração em Fase Sólida (EFS), que será descrita abaixo, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm para a remoção do material particulado. Alguns estudos publicados demonstram que a adsorção dos componentes estrogênicos no filtro pode ser desconsiderada, ou seja, os componentes estrogênicos permanecem em solução e não ficam retidos nos filtros ou no material particulado suspenso (XIAO et al., 2001, DESBROW et al., 1998).

Para a EFS foram filtradas 500 mL das amostras de esgoto, saídas do reator UASB, do sistema de lodos ativados e do filtro de areia.

Extração em fase sólida

Anteriormente ao início do teste toda vidraria foi limpa com solução de Extran – 5%, enxaguada com água de torneira, seguidas por água destilada e ultrapura Milli-Q. Após seca, a vidraria era rinsada com acetona (grau HPLC, JT Baker).

O processo de extração foi realizado em Manifold para 10 cartuchos, da Agilent Technologies. Os cartuchos C₁₈ (500mg) foram previamente condicionados

com 3 x 2 mL de hexano, seguidos por 1 x 2 mL de acetona e 3 x 2 mL de metanol, e por último 5 x 2 mL de água ultrapura Milli-Q com pH ajustado em 3 com ácido sulfúrico.

Após o condicionamento as amostras foram acidificados com H_2SO_4 até pH 3,0 e então passadas nos cartuchos com vazão ajustada em 20 mL/min. Após a extração, o volume foi eluido com 4 x 1 mL de acetona e em seguida seco em um fluxo de nitrogênio dentro da capela com exaustor. O analito então foi ressuspensionado em 2 mL de etanol - grau HPLC, Sigma Aldrich (Figura 14). Quando necessário, as amostras foram refrigeradas a 4 °C para serem analisadas no dia seguinte.

Preparado e conservação das soluções utilizadas no teste YES

O preparo das soluções utilizadas no teste YES foi realizado segundo o protocolo apresentado por Routledge e Sumpter (1996), seguindo as orientações e adaptações de Bila (2005), adotadas no LES (DESMA/UERJ).

O problema de impurezas ou contaminação causa falsos positivos no ensaio YES. Assim, os reagentes, a água e os recipientes usados no preparo das soluções que compõem o meio de cultivo e análise devem apresentar alto grau de pureza (BILA, 2005).

Todos os reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich com alto grau de pureza e armazenados conforme indicação do fabricante. A vidraria e todo material utilizado no preparo das soluções eram exclusivos para o preparado e foram previamente limpos com solução de Extran, água destilada, água ultrapura Milli-Q e enxaguados com etanol (grau HPLC, Sigma Aldrich). A pesagem dos reagentes foi feita em copos descartáveis limpos. Na pesagem a espátula foi limpa com etanol absoluto a cada reagente utilizado.

Após o preparo, os frascos das soluções eram armazenados em frasco Schott em geladeira a 4 °C - com exceção da vitamina que era armazenada congelada no freezer. O manuseio das soluções era realizado somente em capela de fluxo laminar (Marconi) devidamente limpa com álcool e papel higiênico - no sentido de dentro para a fora - e esterilizada com radiação Ultravioleta da própria capela (UV) por 15 minutos. Anteriormente ao manuseio das soluções, os frascos eram retirados da geladeira para que atingissem a temperatura ambiente ideal para a análise.

Figure 14. Fluxograma detalhado da metodologia analítica de extração em fase sólida visando o ensaio YES.

Preparação do Meio Mínimo

O preparo do meio mínimo (pH 7,1) é dado pela adição dos seguintes reagentes em 1 L de água ultrapura Milli-Q: 13,61 g de KH_2PO_4 , 1,98g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,2g de KOH peletes, 0,2g de MgSO_4 , 1 mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40 mg/50 mL de água ultrapura Milli-Q), 50 mg de L-leucina, 50 mg de L-histidina, 50 mg de adenina, 20 mg de L-arginina-HCl, 20 mg de L-metionina, 30 mg de L-tirosina, 30 mg de L-isoleucina, 30 mg de L-lisina-HCl, 25 mg de L-fenilalanina, 100 mg de L-ácido glutâmico, 150 mg de L-valina, e 375 mg L-serina.

Em seguida a solução foi armazenada em 5 frascos Schott de vidro (200 ml) e esterilizada a 121 °C por 20 min em autoclave. Os frascos foram estocados na geladeira, com o cuidado de vedar a tampa do frasco com filme plástico.

Preparação da solução de Vitamina

A solução foi preparada adicionando-se os seguintes reagentes em 180 mL de água ultrapura Milli-Q: 8 mg de tiamina, 8 mg de piridoxina, 8 mg de pantetonato de cálcio, 40 mg de inositol e 20 mL de solução de biotina (2mg/100 mL de água Milli-Q). A solução foi esterilizada utilizando-se um kit de filtração estéril, com membrana de 0,2 μm , e armazenada a 4° C em 5 alíquotas de 20 mL em tubos falcon estéreis vedados com filme plástico. Todo o procedimento de filtração foi realizado em capela de fluxo laminar.

Preparação da solução de Glicose

Preparou-se uma solução de 20% p/v (20 g/100 mL) dissolvendo a glicose em água ultrapura. Foram divididos em 5 alíquotas de 20 mL e esterilizada em autoclave a 121 °C por 10 minutos. A solução foi vedada com filme plástico e armazenada em geladeira.

Preparação da solução de Ácido L-aspártico

O preparo foi feito a partir de uma solução estoque de 4 mg/mL (400 mg/100 mL) de ácido aspártico. Foi separada em 5 alíquotas de 20 mL, esterilizadas a 121 °C por 10 minutos e estocadas em geladeira devidamente vedadas com filme plástico.

Preparação da solução de L-treonina

O preparo foi feito a partir de uma solução estoque de 24 mg/mL (600 mg/25 mL) de L-treonina. A solução foi separada em 5 alíquotas de 20 mL, esterilizadas a 121 °C por 10 minutos e estocadas em geladeira devidamente vedadas com filme plástico.

Preparação da solução de Sulfato de Cobre (II)

A solução de sulfato de cobre (II) foi preparada na concentração de 20 mM (0,5g/100mL) com água ultrapura. A solução foi esterilizada utilizando-se um kit de filtração estéril com membrana de 0,2 µm e armazenada em geladeira no mesmo recipiente de filtração. Todo procedimento de filtração foi realizado em capela de fluxo laminar devidamente esterilizada.

Preparação da solução de CPRG

A solução de CPRG foi pesada e preparada no dia que em os testes foram realizados. Seu preparado foi feito na concentração de 10 mg/L de CPRG, utilizando água ultrapura Milli-Q previamente esterilizadas em câmara de UV por 20 minutos.

Preparação do meio de cultivo

O meio de cultivo foi preparado pela adição de: 5 mL da solução de glucose; 1,25 mL da solução de ácido L-aspartico; 0,5 mL da solução de vitamina; 0,4 mL da solução de L- treonina; 125 µL da solução de sulfato de cobre (II) e 45 mL de meio mínimo.

O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar esterilizada e a solução foi armazenada em frasco de vidro estéril à temperatura ambiente. O meio de cultivo foi utilizado dentro do prazo máximo de 2 semanas. No dia do teste o meio de cultivo foi preparado, preferencialmente, sempre no momento do seu uso.

Preparação do meio de análise para o ensaio

O meio de análise foi preparado adicionando 250 µL do substrato cromogênico – CPRG- a 25 mL de meio de cultivo. O meio foi inoculado com 4×10^7 células de levedura de um cultura que deveria ter uma absorbância de 0,8 em comprimento de onda de 630 nm.

Cultivo da Cepa de Levedura de Saccharomyces cerevisiae

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi gentilmente cedida pela Profa. Marcia Dezotte (UFRJ) e Profa. Daniele Maia Bila (UERJ). O preparo da cepa foi realizado segundo o protocolo apresentado por Routledge e Sumpter (1996), também utilizado no Laboratório de Engenharia Sanitária (DESMA/UERJ) sob a supervisão da Profa. Daniele Bila.

Logo após o recebimento da cepa principal vindas da UERJ, e a cada 4 meses, a cepa era repicada e incubada a 28 °C e 100 rpm para conservar a linhagem principal da cepa recebida em freezer a -20 °C. O processo de repique para congelamento foi dado a partir de um frasco “T” estéril com 10 mL de meio de cultivo e 100 µL de levedura da cepa principal, sendo incubado a 28 °C e 100 rpm até que se atingisse 0,8 de absorbância em 630 nm. Todo procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

Foram adotadas as seguintes etapas do protocolo de conservação da cepa:

1. Preparou-se a solução de meio minimal + glicerol (15%) em um tubo Falcon de 50 ml;
2. Adicionou-se 42,5 mL de meio mínimo + 7,5 mL de glicerol;
3. Em dois tubos Falcon estéril de 15 ml, adicionou-se 5,0 da cultura repicada de levedura em cada tubo;
4. Os tubos foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 2000 giros;
5. Retirou-se o sobrenadante;
6. Em cada tubo Falcon (15 mL) foi adicionado 5,0 mL do meio minimal com 15% de glicerol
7. Ao final os tubos foram vedados com parafilme e congelados a -20°C.

O procedimento de repique para o teste YES foi realizado próximo à realização do teste, de 1 a 3 dias antes, para que a cepa repicada fosse fresca. Para isso adicionava-se 100µL da cultura de levedura em um frasco de cultivo contendo 10 mL de meio de cultivo. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Os frascos de cultivo foram incubados a 28 °C e 100 rpm e utilizados no dia do ensaio.

4.4.1 Procedimento Teste YES

As amostras foram analisadas em duplicatas e a curva de 17β -estradiol foram feitas em quadruplicatas. O procedimento para o teste seguiu as orientações de Routledge e Sumpter (1996) e as adaptações de Bila (2005). O teste foi realizado em placas de 96 poços para cultura, com fundo chato e tampa estéreis (TPP). Anteriormente ao início do teste, todo o material utilizado para manuseio e armazenamento foi previamente esterilizado em UV por 15 minutos. Foram utilizadas apenas ponteiras novas e autoclavadas.

As fileiras A, C, E, G foram utilizadas para a amostra ou curva. Enquanto que as fileiras B, D, F, H foram utilizadas como branco – etanol (Figura 15).

Figure 15. Disposição das amostras/ curvas nas fileiras e colunas da microplacas de 96 poços.

Diluições utilizadas para a curva de 17β -Estradiol e para as amostras

As diluições para amostras e para o preparo das curvas foram realizadas em um microplaca de 96 dedicada apenas para as diluições em questão. O procedimento adotado, tanto para as amostras quanto para curvas, foi realizado com diluições 1:2, sempre utilizando uma fileira para cada série de diluição. Conforme apresentado abaixo:

Diluição da curva de 17β -Estradiol

1. Foi adicionado 100 μ L de etanol absoluto nos poços da fileira de diluição, com exceção do primeiro poço. Ou seja, 100 μ L do poço 2A até 12A (Figura 15);

2. No 1º poço (1A) foi adicionado 200 µL de solução estoque de 17β-Estradiol;
3. No 2º poço (2A) foi adicionado 100 µL da solução do 1º poço (1A) e agitar;
4. No 3º poço (3A) foi adicionado 100 µL da solução do 2º poço (2A) e agitar;
5. E assim sucessivamente até o último poço da fileira, que ficou com o volume final de 200µL.

A solução padrão da curva diluída foi transferida imediatamente para a placa de análise, no volume de 10 µL de cada concentração, em quadruplicata. Deixou-se as amostras evaporarem, dentro da capela de fluxo laminar, para dar prosseguimento ao teste. Na transferência, tomou-se o cuidado de não encostar as ponteiros nas bordas dos poços para impedir contaminação dos poços vizinhos.

O teste YES baseia-se necessariamente em uma curva de 17β-Estradiol como referência. Esta curva padrão de 17β-estradiol foi preparada através de uma diluição em série, conforme mostrada acima, de uma solução estoque de 17β-estradiol (54,48 µg.L⁻¹) em etanol absoluto (faixa de 54,48 µg. L⁻¹ a 26,61 ng. L⁻¹).

Diluição das amostras

- Foi adicionado 100 µL de etanol absoluto nos poços da fileira de diluição, com exceção do primeiro poço. Ou seja, 100 µL do poço 2A até 12A (Figura 15);
- No 1º poço (1A) foi adicionado 200 µL de amostra;
- No 2º poço (2A) foi adicionado 100 µL da solução do 1º poço (1A) e agitar;
- No 3º poço (3A) foi adicionado 100 µL da solução do 2º poço (2A) e agitar;
- E assim sucessivamente até o último poço da fileira, que ficou com o volume final de 200µL.

As amostras diluídas foram transferidas imediatamente para a placa de análise, no volume de 10 µL de cada amostra, em duplicata. Deixou-se as amostras evaporarem, conforme o procedimento de Routledge e Sumpter (1996), dentro da capela de fluxo laminar para dar prosseguimento ao teste. Durante a preparação das placas, também tomou-se o cuidado de não encostar a ponteira na borda dos poços, para evitar contaminação dos poços vizinhos.

Preparo do meio de análise para o teste YES

O preparo do meio de análise para o ensaio foi realizado em tubos do tipo Falcon estéreis. Foi inicialmente preparado o meio com a levedura e em seguida o

meio de análise. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. O preparo seguiu o roteiro apresentado:

Preparo do meio com a cultura de levedura

Em um tubo Falcon estéril foram adicionados 4,0 mL do meio de cultivo e 1,1 mL do cultivo da levedura (preparado de 1 a 3 dias antes do teste, conforme apresentado em 4.5.4. cultivo da cepa). Leu-se então a absorbância a 630 nm desta cultura. O procedimento foi definido conforme a faixa de absorbância atingida:

Absorbância 0,8 a 1,0: faixa boa, cultura pronta para o uso;

Absorbância inferior a 0,8: adicionar pequenos volumes de levedura (de 0,2 a 0,2 mL) até atingir a absorbância de 0,8;

Absorbância superior a 1,0: adicionar pequenos volumes de meio de cultura.

Vale destacar que este procedimento foi todo realizado em capela de fluxo laminar. Uma vez que a cultura foi retirada da capela para a leitura de sua absorbância esta não foi mais utilizada. Portanto, o preparo desta etapa do teste YES foi sempre realizado em duplicata ou ainda em triplicata, já que pelo menos um dos tubos era descartado. Este procedimento é uma adaptação do método original de Routledge e Sumpter (1996) para facilitar a etapa de contagem das células de levedura, e tem sido adotado com sucesso em diversas pesquisas, como Bistan et al (2012) e De Boever et al (2001).

Preparo do meio de análise

Em um tubo Falcon de 50 mL foram adicionados 25 mL do meio de cultivo, 250 µL de solução de CPRG e 25 µL do meio com a cultura de levedura. Foi preparado um tubo falcon com o meio de análise por placa de 96 poços utilizada em cada batelada de testes.

Preparo e montagem das placas

O preparo das placas de análise foi realizado conforme exemplificado na figura 16, a qual representa uma curva padrão de 17β-Estradiol. As linhas A, C, E, G são as curvas. As linhas B, D, F e H são os brancos (somente etanol).

Figure 16. Curva de 17β -estradiol na microplaca de 96 poços.

Para o preparo da placa de análise, adicionou-se inicialmente 10 μ L de etanol em cada placa nas linhas correspondentes aos brancos. Em seguida, foram transferidos 10 μ L de cada amostra para a linha correspondente da placa. Após a evaporação completa das amostras, um volume de 200 μ L de meio de análise (composto de meio de crescimento fresco, levedura e CPRG) foi adicionado em cada poço da microplaca de 96 poços. As microplacas foram seladas com fita crepe, agitadas vigorosamente por 5 min em um agitador e incubadas por 72 horas a 30°C em uma estufa.

Após a incubação, as microplacas foram agitadas e permaneceram em repouso por um período de 1 hora, depois do qual a absorbância foi medida a 550 nm (para a cor) e 630 nm (para a turbidez) usando uma Leitora microplacas de 96 poços.

4.4.2 Análise dos dados do teste YES

O crescimento da levedura é acompanhado por uma turbidez aparente, medida a 630 nm. A mudança da cor amarela (não apresenta atividade) para rosa (máxima atividade), medida por absorbância a 550 nm, indica a atividade estrogênica da amostra.

Nestes ensaios, para corrigir a resposta estrogênica de cada amostra

analisada para turbidez (A_{corr}), a seguinte correção foi aplicada para os dados de cada poço da microplaca.

$$A_{\text{corrigidaAmostra}} = A_{550\text{nmAmostra}} - (A_{630\text{nmAmostra}} - A_{630\text{nmBranco}}) \quad (1)$$

Para cada amostra construiu-se uma curva dose-resposta, em escala logarítmica, com os resultados dos valores experimentais das absorbâncias corrigidas em função da concentração das amostras (curva 17β -estradiol) ou do fator de diluição (amostras analisadas). O 17β -estradiol representa o padrão da atividade estrogênica (controle positivo) para o ensaio YES.

Os valores de EC_{50} (a concentração que elucida uma atividade igual a 50% do controle positivo 17β -estradiol) foram determinados a partir do método apresentado por Alexander et al (1999). Este método é baseado nos princípios de um triângulo retângulo e oferece um caminho simples e preciso para o cálculo deste parâmetro. O cálculo é feito a partir dos pontos apresentados na Figura 17.

Figure 17. Gráfico hipotético utilizado para o cálculo do EC_{50} (ALEXANDER et al., 1999)

O eixo y corresponde aos valores de absorbância corrigidos e o eixo x à concentração (no caso da curva padrão) ou ao fator de diluição (no caso das amostras). Para calcular assumiu-se que a parte ascendente da curva dose-resposta é linear e que os pontos que definem este trecho correspondem à máxima e a mínima indução da β -galactosidase observadas no teste YES.

Baseando no gráfico, foi calculado o valor de Y_{50} que corresponde a 50% da

máxima resposta obtida:

$$Y_{50} = 50\%_{\text{maxresposta}} = (A-B/2) + B \quad (2)$$

A partir da equação 3, calculou-se o valor do EC_{50} da curva padrão de 17 β -estradiol.

$$EC_{50} = D - ((A-50\%_{\text{maxresposta}}) \cdot (D-C)) / A-B \quad (3)$$

Para calcular o EC_{50} das amostras, realizou-se primeiramente o ajuste dos dados à curva sigmoidal (DE LEAN et al, 1978):

$$Y = ((A-B)/(1+(x_0/x)^p)) + B \quad (4)$$

Sendo que:

$$P = (A-B) / \log D - \log C \quad (5)$$

Onde: y é o valor de $A_{\text{corrigidaAmostra}}$, ou seja, corresponde ao Y_{50} de cada amostra; A corresponde à máxima indução da atividade estrogênica; B ao limite de detecção; e p é a inclinação do trecho linear da curva (entre A e B); x corresponde ao EC_{50} da amostra; e x_0 corresponde ao EC_{50} da curva padrão de 17 β -estradiol.

Logo, a equação da curva ajustada para x é:

$$x = x_0 / ((A-B/y-B)-1)^{1/p} \quad (6)$$

A partir da equação 7 pode-se calcular os valores de EC_{50} das amostras, expressas em equivalentes de estradiol (EQ- E_2). As curvas dose-resposta das amostras foram estabelecidas em função do fator de diluição, assim, o valor calculado foi corrigido pelo fator de diluição correspondente. Após essa correção chegou-se ao valor real de EC_{50} para cada amostra.

Para método de comparação entre os ensaios, determinou-se a potência relativa estrogênica para cada amostra (BILA, 2005). Determinada como:

$$PR = EC_{50\text{curvapadrão}} / EC_{50\text{amostra}} \quad (7)$$

Os resultados podem se interpretados da seguinte maneira: quanto mais próximo ou maior que 1 o valor de *PR*, maior a estrogenicidade. Ou seja, quanto mais próximo a 0, significa que a amostra possui menor potencial estrogênico.

A determinação da potência relativa em relação ao padrão de 17β-estradiol pode ser considerada como um ensaio biológico indireto. Neste tipo de ensaio assume-se que as amostras analisadas se comportem como uma diluição ou uma forma mais concentrada do padrão. Assim, esta comparação direta entre as amostras é válida somente sob algumas condições. As curvas dose-resposta do padrão e das amostras devem ser paralelas e a máxima resposta que pode ser atingida por ambas deve ser idêntica. As curvas podem diferenciar em sua posição em relação ao eixo x (devido às amostras estarem mais diluídas ou concentradas), mas devem manter a condição de serem paralelas entre si (VILLENEUVE et al, 2000).

Em algumas amostras observou-se a ocorrência de toxicidade, o que resultou na inibição do crescimento da levedura. Nestas amostras utilizou-se a relação apresentada por Frische et al (2009), que utiliza o controle da absorbância 630 nm como ferramenta para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido à toxicidade das amostras, conforme a relação:

$$\text{Toxicidade} = 1 - (\text{Abs}_{630\text{amostra}} / \text{Abs}_{630\text{branco}}) \quad (8)$$

Onde, $\text{Abs}_{630\text{nmAmostra}}$ corresponde à média da leitura de absorbância a 630 nm de cada diluição da amostra, ou seja, à média da duplicata de cada um dos poços da linha da amostra. Logo, $\text{Abs}_{630\text{branco}}$ corresponde à média da leitura de absorbância a 630 nm para as duas linhas de branco (somente etanol) correspondentes a cada amostra analisada em duplicata. Assim, neste cálculo é considerada a média de 24 poços.

4.5 Métodos para recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

A metodologia de análise foi baseada em Medeiros (2013). As amostras de esgoto para análise foram coletadas na ETE do campus da USP na cidade de São Carlos-SP. Foram utilizados frascos plásticos previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução de eluição – Tween 80 (0,1 %; v/v) – e analisadas no máximo 12 horas após a coleta que foi realizada sempre no horário da manhã.

Anteriormente ao início das análises todos os materiais que iriam entrar em contato com as amostras (beckers, erlenmeyers, tubos de centrifugação, tubos de microcentrifugação, ponteiros, alças, membranas e sistema de filtração) foram enxaguados com a solução de eluição - Tween 80 - para evitar que protozoários ficassem aderidos aos materiais.

Conforme Medeiros (2013), que adaptou as metodologias usadas por McCuin e Clancy (2005) e Franco et al. (2001), as amostras das etapas de tratamento foram avaliadas, em função da turbidez, nos seguintes métodos:

- Amostras de esgoto bruto e do tratamento primário (UASB) com turbidez média e alta (acima de 45 UNT) foram analisadas por meio de centrifugação seguida de separação imunomagnética (IMS – *Immunomagnetic Separation*);
- Amostras do sistema de lodos ativados e efluente oriundo do filtro de areia com turbidez baixa (abaixo de 45 UNT) foram analisadas por filtração em membrana seguida de separação imunomagnética (IMS).

Centrifugação seguida de Separação Imunomagnética (IMS)

O método de IMS foi utilizado no ensaio para melhorar a recuperação de cistos e principalmente de oocistos. A descrição do método de análise começa com a adição de 150 ml de amostra e 50 ml de solução Tween 80 (0,1 %), que foram homogeneizados com a ajuda de agitador magnético por cerca de 3 minutos. Esse volume foi posteriormente dividido em 4 tubos falcon de centrifugação de 50 ml. Esses tubos foram levados a centrífuga por 15 minutos a uma rotação de 1500 x g e em seguida 49,5 ml o sobrenadante foi retirado, restando apenas 0,5 ml nos 4 tubos. O volume restante nos tubos foi unificado em um só tubo, sendo que em cada um dos três tubos restantes foram realizadas duas lavagens de 0,5 ml com água

deionizada para totalizar 5 ml em um único tubo, o qual foi levado ao vórtex e deixado em geladeira overnight entre 5 e 10 graus Celsius.

No próximo dia iniciou-se a IMS passando o volume do tudo de centrifugação para o tubo de Leighton (tubo com lado plano). Em seguida, o tubo de centrifugação foi lavado duas vezes com 2,5 ml de água deionizada e o volume repassado para o tudo de Leighton. Os passos seguintes foram seguidos conforme o protocolo do fabricante dos Dynabeads (Dynal CG Combo anti-*Cryptosporidium* spp. & *Giardia* spp., Invitrogen Dynal AS, Norway).

Filtração em membrana seguida de separação imunomagnética (IMS)

O método que Medeiros (2013) adaptou de Franco et al. (2001) inicia-se, como dito acima, com o enxague com solução de eluição – Tween 80 (0,1%) de todo material que terá contato com a amostra. A membrana de ésteres mistos de celulose com porosidade de 3 μm (47 mm de diâmetro, Millipore) foi posta no suporte de filtração e então pipetada, aproximadamente 1 ml da solução de eluição, para molhá-la por completo.

A filtragem a vácuo foi realizada com bomba da marca Marconi com fluxo de 4 L.min⁻¹ e pressão de -500 mm Hg. A amostra com baixa turbidez foi filtrada, com o auxílio de uma proveta, até que a membrana se encontrasse completamente colmatada. Em seguida a membrana foi transferida do suporte de filtração para placa de Petri com 5 ml de solução de eluição – Tween 80 (0,1%), onde procedeu-se 3 raspagens de aproximadamente 3 minutos, com o auxílio de uma alça plástica. Após os 3 minutos de cada raspagem o volume contido na placa era transferido para tubo de centrifugação e em seguida outros 5 ml de solução de eluição eram adicionados para que recomeçasse a raspagem e resultasse num volume final de 15 ml.

Após a primeira centrifugação a 1050 *g por 10 minutos, foi retirado de 10 mL de sobrenadante, deixando os 5 mL restante. O tubo de centrifugação então foi levado ao vórtex, logo em seguida, com acréscimo de 10 mL de água deionizada. A segunda centrifugação foi realizada com a mesma força relativa de centrifugação (g) e em seguida foram retirados 10 mL do sobrenadante, deixando apenas 5 mL. Este volume foi levado ao vórtex e deixado overnight em geladeira, entre 5 e 10 graus Celsius, para só no próximo dia realizar a etapa de detecção.

Iniciou-se a IMS passando o volume do tubo de centrifugação para o tubo de Leighton (tubo com lado plano). Em seguida, o tubo de centrifugação foi lavado duas vezes com 2,5 ml de água deionizada e o volume repassado para o tubo de Leighton. Os passos seguintes foram seguidos conforme o protocolo do fabricante dos Dynabeads (DynaL CG Combo anti-*Cryptosporidium* spp. & *Giardia* spp., Invitrogen Dynal AS, Norway).

Separação Imunomagnética (IMS - Immunomagnetic Separation)

A separação imunomagnética é uma ferramenta que isola cistos e oocistos dos interferentes contidos nas amostras. O procedimento descrito abaixo foi utilizado para executá-la.

- Primeiramente o Kit de IMS (Invitrogen Dynal AS, Norway) foi retirado da geladeira para ficar à temperatura ambiente.
- O volume da etapa anterior, de concentração, seja por centrifugação ou filtração em membrana, foi passado ao vórtex e despejado em um tubo de lado plano (T_{LP}) (DynaL® L10 tubes CAT n° 740.03, Invitrogen Dynal AS, Norway), previamente enxaguado com solução Tween 80 (0,1%).
- Procedeu-se, por conseguinte, uma dupla lavagem no tubo de centrífuga com 2,5 mL de água deionizada, sendo o volume das lavagens repassado ao T_{LP}, totalizando ao final, 10 mL de amostra.
- Foram acrescentados: 1 mL de cada um dos dois tampões (A e B) presentes no Kit de IMS; 100 µL dynabeads anti-*Giardia* spp. e 100 µL dynabeads anti-*Cryptosporidium* spp., de acordo com o protocolo do fabricante (DynaL CG - Combo anti-*Cryptosporidium* spp. & *Giardia* spp.).
- Os T_{LP} foram encaminhados ao misturador de amostras (Dynabeads® Sample Mixer, InvitrogenTM USA) por uma hora a uma velocidade de 18 rpm em temperatura ambiente (Figura 13).
- Depois de transcorrido o tempo, os T_{LP} foram levados ao concentrador de partículas magnéticas (DynaL MPC 1, Cat. no 120.01D; Invitrogen Dynal AS, Norway), onde foram feitas rotações de 90° por 2 minutos; sendo aplicada, em média, uma rotação por segundo. Este procedimento tem o intuito de homogeneizar os dynabeads, que serão ligados aos protozoários para em seguida serem capturados pelo ímã.

- O tubo foi então invertido, para descarte do sobrenadante, mantendo o seu lado plano voltado para cima.
- Em seguida, o T_{LP} foi desacoplado do MPC-1 e foram realizadas duas lavagens de 0,5 mL com tampão A do próprio kit diluído a 10 vezes.
- Os volumes de cada tubo foram coletados com auxílio de pipetas Pasteur e transferidos para tubos de microcentrifuga.
- Os tubos de microcentrifuga foram colocados em outro concentrador de partículas (MPC S, Cat. no120.20D, Invitrogen Dynal AS, Norway), já com a faixa magnética no local. Em seguida foram agitados por 1 minuto mantendo o movimento em um ângulo de 90° (figura 18).
- O sobrenadante foi aspirado e descartado. Após esta ação, a fita magnética do concentrador de partículas foi retirada para a realização da dissociação ácida dos (oo)cistos.

Figura 18. Misturador de amostra

Dissociação ácida de (oo)cistos

A dissociação foi realizada em duas etapas a fim de se aumentar a porcentagem de recuperação de (oo)cistos, como é proposto pelo método 1623 (USEPA, 2012). Na primeira etapa eram adicionados 50 μ L de ácido clorídrico (0,1 N) e na segunda etapa 25 μ L. Cada etapa consistiu em:

- Após a adição de ácido, os tubos de microcentrifuga foram agitados em vórtex por 10 segundos, tendo-se o cuidado de o material não atingir a tampa, e colocados no concentrador de partículas magnéticas (MPC-S) sem a fita magnética.
- Decorridos 10 minutos em repouso, na posição vertical e em temperatura ambiente, levou-se ao vórtex novamente por 10 segundos.
- Os tubos de microcentrifuga voltaram para o concentrador de partículas (MPC-S) no qual foram inseridas a fita magnética, mantendo-os em repouso por, no mínimo,

10 segundos.

Em seguida, ocorria a seguinte preparação das placas presentes no kit Merifluor (Meridien Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio), utilizado para detecção de (oo)cistos: adicionou-se 7,5 µL de hidróxido de sódio (1 N) nos poços (wells) das placas cuja finalidade era neutralizar 75 µL de ácido (50 + 25 µL das duas etapas de dissociação), e depois se transferia o sobrenadante dos tubos de microcentrifuga para os poços das lâminas.

Após a etapa de IMS, as placas ficaram em repouso até as amostras secarem em temperatura ambiente (aproximadamente 4 horas), para assim se dar início à etapa de detecção e identificação de cistos e oocistos.

Deteção e identificação

A detecção e identificação dos (oo)cistos foram realizadas por Reação de Imunofluorescência Direta (RID) com o kit Merifluor. Primeiramente a amostra foi fixada com metanol absoluto (20 a 50 µL) por 10 minutos. Em seguida, aplicou-se uma gota do fluido de detecção e uma gota do contra-corante, ambos presentes no kit Merifluor, para só então a placa ser levada para câmara úmida, no escuro, a 37°C por 30 minutos.

Decorrido este tempo, foi realizada a lavagem do poço, sendo aplicado duas lavagens de 50 µL de água deionizada (totalizando 100 µL) no poço da placa e a mesma inclinada a um ângulo de 45° para que a água escorresse. Em seguida foi adicionada uma gota de meio de montagem presente no kit Merifluor e, por fim, a lamínula foi colocada.

A contagem de (oo)cistos no poço foi realizada sempre respeitando o prazo máximo de 7 dias (USEPA, 2012), utilizando microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) com aumento de 300 a 800 vezes. A contagem foi feita conforme proposto por Cantusio Neto (2004), usando-se a equação:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de (oo)cistos detectados} \times 10^6 \times \text{volume total do sedimento (mL)}}{\text{volume de sedimento na lamina (}\mu\text{L)} \times \text{volume da amostra (mL)}} \quad (9)$$

A técnica de Reação de Imunofluorescência Direta (RID) nos permitiu avaliar a presença de:

- Oocistos - estruturas esféricas de 4 a 6 μm e;
- Cistos - ovóides de 8 a 18 μm de comprimento por 5 a 15 μm de largura.

A parede deve mostrar fluorescência verde-maçã brilhante, sem poros ou apêndices e apresentar (oo)cisto visível exibindo forte fluorescência.

Ensaio de Controle Negativo

Foram realizados três ensaios para avaliar a contaminação no transcorrer do procedimento de análise. O controle negativo foi realizado com amostras da água deionizada, ausente de protozoários, utilizada nos ensaios, ao invés de amostra de esgoto.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., 2004). Diferenças significativas entre as médias de recuperação dos métodos foram determinadas de acordo com ANOVA (*One Way Analysis of Variance*) com aplicação do teste t de *Student*, baseado na hipótese nula de médias iguais de recuperação para os métodos. Em todos os testes, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados da 1 etapa – ensaios físico-químico

Os ensaios de tratamento físico-químico foram feitos em forma de participação na pesquisa de mestrado de Gabriela Laila de Oliveira (OLIVEIRA, 2012) e os resultados foram reproduzidos nessa tese (itens 5.1 a 5.2) com o objetivo de compará-los com os resultados obtidos no tratamento biológico (reator UASB e lodo ativado) e no filtro de areia, exclusivamente para a presente tese. Alguns dos resultados obtidos por Oliveira (2012) tiveram a forma de apresentação modificada de tabela para figuras com o objetivo de facilitar a interpretação. Os dados de micro e macronutrientes foram quantificados exclusivamente para a presente tese.

Nesse tópico serão apresentados os resultados obtidos em duas etapas:

1. Resultados dos ensaios preliminares dos tratamentos físico-químicos realizados no Jar Test, visando definir o pH de coagulação, a dosagem de coagulante e a velocidade de sedimentação para cada um tratamentos listados a seguir:
 - Efluente do reator UASB tratado com sulfato de alumínio.
 - Efluente do reator UASB tratado com cloreto férrico.
 - Efluente do lodo ativado tratado com sulfato de alumínio.
 - Efluente do lodo ativado tratado com cloreto férrico.
- Resultados da fase inicial da pesquisa que foi realizada em cinco ensaios nas respectivas datas: 1º (10/11/11), 2º (17/11/11), 3º (24/11/11), 4º (01/12/11) e 5º (08/12/11).

Os coagulantes utilizados nos ensaios foram adquiridos na forma líquida com concentração definidas e diluídos em dosagem menores para serem utilizados em cada ensaio.

5.1.1 Resultados dos ensaios preliminares com Jar Test

Em todos os ensaios preliminares que serão apresentados foram utilizados os mesmos parâmetros de mistura: gradiente de mistura (Gm) de 375 rpm; tempo de mistura (Tm) 30 segundos, gradiente de floculação (Gf) 65 rpm; tempo de floculação (Tf) 25 minutos e velocidade de sedimentação (Vs), após definidas as curvas de sedimentação em temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ensaio Preliminar com efluente do reator UASB tratado com sulfato de alumínio

Para a amostra de esgoto do reator UASB foram utilizadas as dosagens do coagulante sulfato de alumínio de: 20; 50; 100; 150; 200 e 250 mg/L. A amostra apresentou pH inicial de 6,88 e turbidez inicial de 109 NTU.

A velocidade de sedimentação na qual se obteve menor fração de turbidez remanescente foi 0,71 cm/min, exceto para a dosagem de 20 mg/L de sulfato de alumínio. No entanto, levando em consideração que o menor valor aceitável para projeto, para estações de tratamento de água, é 15 m/d ou 1cm/min (NBR 12216/92, usada como referência por não se dispor de norma específica para sedimentação de lodo de tratamento físico-químico de esgoto), adotou-se Vs de 1cm/min para as demais bateladas referentes a este tratamento (Figura 19). Observou-se que de acordo com a Vs adotada (1 cm/min) as dosagens mais satisfatórias foram de 100 e 250 mg/L de sulfato de alumínio. Com o intuito de verificar a dosagem ainda mais satisfatória foram realizadas mais duas bateladas para esse tratamento com intervalos menores entre as dosagens (100, 125, 150, 175, 200, 225 mg/L e 140, 150, 160, 170, 180 e 190 mg/L). As Figuras 20 e 21 representam os resultados correspondentes à 2ª e 3ª bateladas.

Figura 19. Curvas de sedimentação referentes à amostra de efluente do reator UASB utilizando sulfato de alumínio como coagulante. DSA = Dosagem de Sulfato de alumínio.

Figura 20. Turbidez remanescente e pH de coagulação na segunda batelada utilizando efluente do reator UASB e sulfato de alumínio como coagulante. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Figura 21. Turbidez remanescente e pH de coagulação na terceira batelada utilizando efluente do reator UASB e sulfato de alumínio como coagulante. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Visualizando os gráficos é possível verificar que entre as dosagens de 150 e 200 mg/L não existe variação significativa com relação à remoção de turbidez, uma vez que esta varia de 44 a 46 NTU nestas dosagens. Na quarta e quinta bateladas foram fixadas duas dosagens intermediárias de sulfato de alumínio, 170 e 190 mg/L, respectivamente. No entanto, o pH de cada jarro foi ajustado em 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5

e 8 visando verificar o pH de coagulação mais satisfatório para essas condições (Figuras 22 e 23).

Figura 22. Turbidez remanescente na quarta batelada com dosagem de 170 mg/L de sulfato de alumínio e ajuste de pH inicial em 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 e 8 da amostra do efluente do reator UASB. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Figura 23. Turbidez remanescente na quarta batelada com dosagem de 190 mg/L de sulfato de alumínio e ajuste de pH inicial em 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 e 8 da amostra do reator UASB. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Conforme consta nas figuras 22 e 23, pode-se observar que o pH de coagulação em torno de 7, ou seja, pH neutro é o mais adequado para essas

condições de tratamento, independente da concentração de coagulante utilizada (170 ou 190 mg/L).

De acordo com o ensaio preliminar adotou-se o valor de 170 mg/L de dosagem do coagulante sulfato de alumínio e pH de coagulação 7 para os demais ensaios que foram realizados com esse tratamento, apesar da variação temporal das características do esgoto. Ao final desse primeiro ensaio, optou-se pela dosagem de 170 mg/L pelo fato de que não houve diferenças significativa na remoção da turbidez comparando com a dosagem de 190 mg/L. Com isso, optou-se pela menor dosagem levando em consideração condições econômicas.

Ensaio Preliminar com efluente do reator UASB tratado com cloreto férrico (FeCl_3)

As amostras do segundo ensaio coletadas no reator UASB apresentaram pH inicial de 6,62 e turbidez inicial de 92,1 NTU. As dosagens do coagulante cloreto férrico foram nas mesmas proporções do ensaio anterior (20; 50 100; 150; 200 e 250 mg/L). As curvas de sedimentação elaboradas nesse ensaio estão representadas na Figura 24.

Visualizando os resultados da curva de sedimentação verifica-se que, exceto para 50 mg/L, nas demais dosagens de coagulante as velocidades de sedimentação de 1,14 e 0,71 cm/min foram as que proporcionaram menor fração de turbidez remanescente. No entanto, assim como no ensaio anterior, foi adotada a velocidade de sedimentação de 1cm/min, que é o menor valor aceitável para projeto para estações tratamento de água, conforme justificado anteriormente.

Após se adotar a velocidade de sedimentação, as dosagens mais satisfatórias foram 150, 200 e 250 mg/L. A partir dessas dosagens foi feita a segunda batelada desse ensaio com o efluente do reator UASB recebendo o coagulante cloreto férrico com dosagens de 150, 165, 170, 180, 190, 200 mg/L. A dosagem mais satisfatória está demonstrada na Figura 25.

Figura 24. Curvas de sedimentação referentes à amostra de efluente do reator UASB utilizando cloreto férrico como coagulante. DCF = Dosagem de cloreto férrico.

Figura 25. Turbidez remanescente e pH de coagulação na segunda batelada utilizando efluente do reator UASB e cloreto férrico como coagulante. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

De acordo com a Figura 25, a dosagem mais satisfatória para este tratamento foi a de 170 mg/L de cloreto férrico, de modo que, esta atingiu menor valor de turbidez remanescente, 9 NTU. Com a dosagem mais satisfatória já definida, foi realizada a terceira batelada com a dosagem fixa em 170 mg/L e ajustando o pH inicial para seis valores diferentes, sendo eles 5; 6; 6,5; 7; 8 e 8,5. O pH de

coagulação mais satisfatório encontrado para essa dosagem de coagulante foi de, aproximadamente, 6,5 com a turbidez remanescente próxima a 11 NTU (Figura 26).

Figura 26. Turbidez remanescente e pH de coagulação na terceira batelada com dosagem de 170 mg/L de cloreto férrico e ajuste de pH inicial em 5; 6; 6,5; 7; 8 e 8,5 da amostra do efluente do reator UASB. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Ensaio preliminar com efluente do sistema de lodo ativado tratado com sulfato de alumínio

O ensaio preliminar com a amostra de esgoto do lodo ativado utilizando sulfato de alumínio como coagulante foi feito com as seguintes dosagens: 20; 50; 100; 150; 200 e 250 mg/L. A amostra apresentou pH inicial de 6,28 e turbidez inicial de 15 NTU.

De acordo com a Figura 27, para todas as dosagens, exceto para a de 200 mg/L, a velocidade de sedimentação mais satisfatória foi 0,71 cm/min. Porém a dosagem em que se obteve menor fração de turbidez remanescente foi a de 20 mg/L de sulfato de alumínio. Levando em consideração parâmetros de projeto, para estações de tratamento de água, optou-se por uma Vs de 1 cm/min, uma vez que, para a dosagem mais satisfatória as melhores velocidades de sedimentação foram entre 1,14 e 0,71 cm/min.

A partir da curva de sedimentação adotou-se a dosagem de 20 mg/L de sulfato de alumínio, que teve a melhor eficiência entre as dosagens testadas. Com isso, foram escolhidas as dosagens de 10, 15, 20, 25, 30 e 25 mg/L de sulfato de alumínio a fim de definir qual a melhor dosagem em torno de 20 mg/L (Figura 28).

Figura 27. Curvas de sedimentação referentes à amostra do efluente do sistema de lodo ativado utilizando sulfato de alumínio como coagulante. DSA = Dosagem de Sulfato de alumínio.

Figura 28. Turbidez remanescente e pH de coagulação na segunda batelada variando a dosagem de sulfato de alumínio em 10, 15, 20, 25, 30, 35 mg/L na amostra do sistema de lodo ativado. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Analisando os resultados das dosagens, verificou-se que a turbidez final variou de 9 a 19 NTU, não sendo representativo para remoção dessa variável. Dessa forma, realizaram-se mais três bateladas fixando as dosagens em 10, 20 e 30 mg/L, respectivamente, e variando o pH de coagulação em 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 e 9 em cada uma das três bateladas. Deu-se preferência por pH ajustados em torno de

neutro para básico, uma vez que, na batelada anterior foi observado uma menor eficiência com pH de coagulação com característica de meio ácido.

Figura 29. Turbidez remanescente e pH de coagulação na terceira batelada com dosagem de 10 mg/L de sulfato de alumínio e ajuste de pH inicial em 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 e 9 da amostra do sistema de lodo ativado. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Para a dosagem de 10 mg/L, observa-se que o pH de coagulação mais satisfatório, levando em consideração o parâmetro turbidez, foi entre 7,5 e 8 (Figura 29). Com a dosagem de 20 mg/L de sulfato de alumínio observa-se que o pH de coagulação que apresentou menor turbidez remanescente (10 NTU) foi em torno de 6,4 (Figura 30). Por fim, foi realizada a ultima batelada fixando-se a dosagem em 30 mg/L de sulfato de alumínio. Analisando a variável turbidez observa-se que o pH de coagulação mais satisfatório na dosagem de 30 mg/L foi o pH próximo a 5 (Figura 31).

Comparando todos os resultados obtidos nas três dosagens, pode-se concluir que a dosagem de 20 mg/L de sulfato de alumínio é a mais eficaz tanto do ponto de vista econômico quanto de eficiência. Apesar de os resultados serem semelhantes em relação à variável turbidez, observa-se que a dosagem intermediária de 20 mg/L produziu valores de turbidez remanescente levemente menores comparado às demais dosagens (10 e 30 mg/L). Com isso, optou-se por dosagem de 20 mg/L e pH de coagulação de 7 para os tratamento com efluentes do sistema de lodo ativado utilizando sulfato de alumínio como coagulante.

Figura 30. Turbidez remanescente e pH de coagulação na quarta batelada com dosagem de 20 mg/L de sulfato de alumínio e ajuste de pH inicial em 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 e 9 da amostra do sistema de lodo ativado. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Figura 31. Turbidez remanescente e pH de coagulação na quinta batelada com dosagem de 30 mg/L de sulfato de alumínio e ajuste de pH inicial em 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 e 9 da amostra do sistema de lodo ativado. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

Ensaio preliminar com efluente do sistema de lodo ativado tratado com cloreto férrico (FeCl_3)

As características iniciais da amostra do sistema de lodo ativado no dia da coleta foram pH inicial de 6,95 e turbidez inicial de 11,9 NTU. Foram utilizadas as seguintes dosagens iniciais de cloreto férrico: 20; 50; 100; 150; 200 e 250 mg/L.

Conforme consta na Figura 32, observa-se que a dosagem de 100 mg/L apresentou melhor desempenho em remoção de turbidez, sendo que a velocidade de sedimentação mais satisfatória foi de 1,14 cm/mim. Na dosagem de 50 mg/L, as velocidades de sedimentação de 1,53, 1,14 e 0,90 cm/mim produziram desempenhos semelhantes. Sendo assim, por questões de projeto e até mesmo de praticidade de análises, adotou-se Vs de 1 cm/mim para este tratamento.

Figura 32. Curvas de sedimentação referentes à amostra do sistema de lodo ativado utilizando cloreto férrico como coagulante. DCF = Dosagem de cloreto férrico.

A segunda batelada desse tratamento foi realizada variando as dosagens em intervalos menores (60, 70, 80, 90, 100 e 110 mg/L de cloreto férrico) com valores próximos daquele que apresentou melhor eficiência na batelada anterior, ou seja, 100 mg/L de cloreto férrico. Cabe ressaltar que durante o ensaio preliminar verificou-se que a amostra de lodo ativado não apresentava muitos sólidos e que a adição de mais uma variável seria interessante. No entanto, optou-se por adotar a cor aparente juntamente com a turbidez como variáveis analisadas (Figuras 33 e 34).

Figura 33. Turbidez remanescente na segunda batelada variando a dosagem de cloreto férrico em 60, 70, 80, 90, 100 e 110 mg/L na amostra do sistema de lodo ativado.

Figura 34. Cor aparente remanescente na segunda batelada variando a dosagem de cloreto férrico em 60, 70, 80, 90, 100 e 110 mg/L na amostra do sistema de lodo ativado. Velocidade de sedimentação de 1 cm/min.

A dosagem de 80 mg/L de cloreto férrico foi a que forneceu o menor valor de turbidez (3,63 NTU) e cor aparente (67 UC) em pH de coagulação próximo a 5,7. Após adotar dosagem de 80 mg/L como sendo a mais satisfatória, optou-se por verificar o pH de coagulação ótimo. Com isso realizaram-se mais duas bateladas variando no primeiro momento o pH inicial em 5; 6; 6,5; 7; 8 e 9 (terceira batelada –

Figuras 35 e 36) e no segundo momento em 7,5; 8; 9; 10; 11 e 12 (4ª batelada – Figuras 37 e 38).

Figura 35. Turbidez remanescente na terceira batelada com dosagem de 80 mg/L de cloreto férrico e ajuste de pH inicial em 5; 6; 6,5; 7; 8 e 9 da amostra do sistema de lodo ativado.

Figura 36. Cor aparente remanescente na terceira batelada com dosagem de 80 mg/L de cloreto férrico e ajuste de pH inicial em 5; 6; 6,5; 7; 8 e 9 da amostra do sistema de lodo ativado.

Observando as figuras 35 e 36 nota-se que o pH de coagulação próximo a 6,5 foi o mais satisfatório para a remoção tanto da turbidez quanto da cor aparente.

Buscando verificar o comportamento dessas duas variáveis com essa dosagem em intervalos de pH de coagulação em meio básico (7,5; 8; 9; 10; 11 e 12), observou-se que a turbidez aumentou proporcionalmente com o aumento do pH (Figura 37). No entanto, com pH de coagulação de 6,5 foi obtida a melhor eficiência de remoção de turbidez. Em relação à cor aparente, é possível observar que nos pH de 6,2 e 11,8 a cor aparente remanescente foi, em ambos, 60 uC. Levando em consideração condições econômicas, optou-se por utilizar pH de coagulação próximo de 6,5, uma vez que este foi o mais eficiente tanto na remoção de turbidez quanto de cor aparente.

Figura 37. Turbidez remanescente na quarta batelada com dosagem de 80 mg/L de cloreto férrico e ajuste de pH inicial em 7,5; 8; 9; 10; 11 e 12 da amostra do sistema de lodo ativado.

Figura 38. Cor aparente remanescente na quarta batelada com dosagem de 80 mg/L de cloreto férrico e ajuste de pH inicial em 7,5; 8; 9; 10; 11 e 12 da amostra do sistema de lodo ativado.

5.2 Resultados da 2 etapa - fase inicial da pesquisa

Conforme citado no início deste tópico, a fase inicial da pesquisa resultou em cinco ensaios nas seguintes datas: 1º (10/11/11), 2º (17/11/11), 3º (24/11/11), 4º (01/12/11) e 5º (08/12/11). Em todos os ensaios as amostras de esgoto foram coletadas no período da manhã, entre 7 e 8 horas, afim de padronizar e reduzir a variabilidade temporal dos efluentes. Os sete pontos de coleta analisados no sistema de tratamento foram: esgoto bruto, efluente do reator UASB, efluente do sistema de lodo ativado, efluente do reator UASB tratado com o coagulante sulfato de alumínio, efluente do reator UASB tratado com o coagulante cloreto férrico, efluente do sistema de lodo ativado tratado com o coagulante sulfato de alumínio e efluente do sistema de lodo ativado tratado com o coagulante cloreto férrico.

5.2.1 Monitoramento dos parâmetros físico-químicos

pH e Alcalinidade das amostras

Durante os cinco ensaios iniciais o pH nas amostras de esgoto bruto permaneceram entre 6,08 e 7,06 demonstrando que apesar da variabilidade temporal do esgoto o pH do esgoto bruto se manteve em faixa adequada ao tratamento físico-químico (Figura 39). Observa-se, no entanto uma variação do pH no terceiro e quinto ensaios para o tratamento de lodo ativado com cloreto férrico.

Conforme se analisa os dados da figura 41, observa-se que a alcalinidade total no efluente de lodo ativado nestes dias foi 28 e 35 mg CaCO_3/L , respectivamente, fato esse que justifica a pequena alcalinidade após o tratamento físico-químico com cloreto férrico devido ao consumo de alcalinidade por esse coagulante e diminuição do pH.

Figura 39. Média dos valores de pH nos cinco ensaios realizados.

Figura 40. Média dos valores de alcalinidade parcial ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$) nos cinco ensaios realizados

Figura 41. Valores de alcalinidade total (mg CaCO₃/ l) nos cinco ensaios realizados

A diminuição da alcalinidade total (Figura 41) no sistema de lodo ativado pode estar relacionada com o processo de nitrificação que consome o oxigênio dissolvido (demanda nitrogenada) e liberta H⁺. Observando os dados de nitrogênio amoniacal (Figura 51), nitrito (Tabela 34) e nitrato (Tabela 35) e relacionando com o consumo da alcalinidade no sistema de lodo ativado pode-se entender com mais clareza o processo de nitrificação.

Turbidez

Observando os resultados de turbidez, se nota que embora tenha ocorrido a variação da turbidez no esgoto bruto ao longo dos cinco ensaios, a eficiência de remoção de turbidez dos tratamentos se manteve alta a partir do sistema de lodo ativado que teve papel fundamental removendo em média 87% da turbidez inicial (Figura 42 e tabela 16). Comparando os dois tipos de coagulantes utilizados não foi constatada diferença significativa em relação à eficiência de remoção da turbidez.

Tabela 16 - Eficiência de remoção de turbidez (%) nos tratamentos biológico e físico-químico.

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	51	20	63	-11	-26	19
Ef. de remoção L.A.	94	82	93	83	85	87
Ef. de remoção UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	91	78	94	83	76	85
Ef. de remoção UASB - FeCl_3	95	83	94	87	80	88
Ef. de remoção L.A. - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	97	87	97	87	91	92
Ef. de remoção L.A. FeCl_3	99	92	99	95	98	96

Figura 42. Valores de Turbidez (NTU) nos cinco ensaios realizados.

Cor aparente

Analisando a Tabela 17 e a Figura 43 nota-se que o reator UASB contribuiu na geração de cor para o sistema de tratamento. No entanto, foram constatados valores de remoção da cor verdadeira de até 88%. Houve diferença significativa entre os coagulantes utilizados apenas para o efluente do sistema de lodo ativado no qual o uso de cloreto férrico obteve uma média de remoção de 75%, contra 41% do sulfato de alumínio (Tabela 17). Apesar da eficiência média constada de até 75%, os valores justificam a instalação do pós-tratamento com filtro de areia após o sistema de lodo ativado proposto no presente trabalho.

Tabela 17 - Eficiência de remoção de cor verdadeira (%) nos tratamentos biológico e físico-químico

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	2,0	-20	-4	4,0	-38	-11
Ef. de remoção L.A.	33	18	41	37	4,0	27
Ef. de remoção UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	61	59	59	73	64	63
Ef. de remoção UASB - FeCl_3	69	58	60	71	65	65
Ef. de remoção L.A. - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	51	36	48	50	19	41
Ef. de remoção L.A. - FeCl_3	78	56	88	71	81	75

Figura 43. Cor verdadeira (uC) no esgoto bruto e nos efluentes nos cinco ensaios realizados.

Figura 44. Cor aparente (uC) no esgoto bruto e nos efluentes nos cinco ensaios realizados.

Dureza

Observando os ensaios realizados nota-se que apenas no quinto ensaio a eficiência de remoção de dureza foi positiva em relação ao esgoto bruto (Tabela 18 e Figura 45). No entanto, analisando os valores em termos de classificação da dureza da água nota-se que a maioria dos valores está margeando o limite entre água mole ($< 50 \text{ mg/ CaCO}_3\text{L}$) e água com dureza moderada (dureza entre 50 e 150 $\text{mg CaCO}_3\text{/L}$). Essa variável é de extrema importância quando se refere ao reuso industrial, pois causa incrustações nas tubulações de água quente, caldeiras e aquecedores (devido à maior precipitação do cálcio e magnésio em temperaturas elevadas).

Tabela 18 - Eficiência de remoção de dureza (%) nos tratamentos biológico e físico-químico .

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	-11	11	0	-8	37	6
Ef. de remoção L.A.	-39	-5	-6	-10	30	-6
Ef. de remoção UASB - Al ₂ (SO ₄) ₃	-22	-11	4	2	17	-2
Ef. de remoção UASB - FeCl ₃	-17	-42	-2	-4	22	-8
Ef. de remoção L.A.- Al ₂ (SO ₄) ₃	-33	-37	-28	-16	7	-21
Ef. de remoção L.A. - FeCl ₃	-22	-16	-32	-10	15	-13

Figura 45. Dureza ($mg\ CaCO_3/l$) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

Demanda química de oxigênio (DQO)

Em relação à DQO (Figura 46), no afluente bruto observou-se uma maior variação principalmente nos quarto e quinto ensaios nos quais os valores foram menores (323 e 293 mg/L). Essa queda se deu possivelmente devido o início das férias no campus da USP/ São Carlos e início da estação chuvosa alterando a diluição do esgoto na estação do campus. A maior eficiência de remoção da DQO observada foi no tratamento do lodo ativado com cloreto férrico, no qual se registrou valores de até 96%, ocorrido no terceiro ensaio (Tabela 19). No entanto, para o tratamento físico-químico do efluente do reator UASB o coagulante que teve a melhor eficiência foi o sulfato de alumínio com uma média de 70%. Esse mesmo cenário foi também confirmado com as análises de DQO solúvel (Tabela 20 e Figura 47)

Devido a problemas de contaminação ocorridos nas análises de DBO os dados não foram consistentes para serem apresentados. Por esse problema, não foi possível analisar a relação entre DBO/DQO nas amostras do experimento.

Figura 46. DQO (mg/L) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

Tabela 19 - Eficiência de remoção de DQO (%) nos tratamentos biológico e físico-químico

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	76	42	74	-12	-1	36
Ef. de remoção L.A.	89	78	95	35	36	67
Ef. de remoção UASB - $Al_2(SO_4)_3$	88	73	92	47	51	70
Ef. de remoção UASB - $FeCl_3$	89	75	92	49	25	66
Ef. de remoção L.A.- $Al_2(SO_4)_3$	90	79	93	52	51	73
Ef. de remoção L.A. - $FeCl_3$	93	81	96	68	60	80

Tabela 20 - Eficiência de remoção (%) dos tratamentos para o parâmetro DQO solúvel.

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	63	46	79	43	86	63
Ef. de remoção L.A.	79	64	96	52	64	71
Ef. de remoção UASB - $Al_2(SO_4)_3$	76	NR	94	46	78	73
Ef. de remoção UASB - $FeCl_3$	79	NR	96	58	38	68
Ef. de remoção L.A.- $Al_2(SO_4)_3$	81	NR	95	25	83	71
Ef. de remoção L.A. - $FeCl_3$	88	NR	90	57	86	80

Figura 47. DQO solúvel ($\text{mg O}_2/\text{L}$) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados. *NR= Não realizado.

Carbono orgânico dissolvido (COD)

Nos cinco ensaios a eficiência de remoção de COD para efluente do reator UASB teve variação entre 46 e 77% e valores entre 28,57 e 68,04 (Tabela 21 e Figura 48). O sistema de lodo ativado teve uma eficiência média 89% de remoção com relação ao afluente bruto. No entanto, o tratamento que teve a maior eficiência foi o lodo ativado com o coagulante sulfato de alumínio que atingiu 95% de eficiência, com médias dos ensaios de 90%. No tratamento com efluente do reator UASB o coagulante cloreto férrico obteve uma leve vantagem quando comparado com o sulfato de alumínio, 69 contra 65%.

Figura 48. COD (mg C/l) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

Tabela 21 - Eficiência de remoção de COD (%) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos tratamentos.

Tratamento/Ef. Remoção	1°	2°	3°	4°	5°	Média
Ef. de remoção UASB	56	63	77	46	70	62
Ef. de remoção L.A.	90	84	93	90	86	89
Ef. de remoção UASB - $Al_2(SO_4)_3$	67	53	74	58	72	65
Ef. de remoção UASB - $FeCl_3$	82	63	73	61	66	69
Ef. de remoção L.A.- $Al_2(SO_4)_3$	92	85	95	90	87	90
Ef. de remoção L.A. - $FeCl_3$	92	84	93	84	88	88

Fósforo

Conforme se pode observar nos resultados referentes ao fósforo (Tabela 22 e Figura 49), o tratamento físico-químico dos efluentes do reator UASB e do lodo ativado com o coagulante cloreto férrico a eficiência de remoção média foi de 89 e 83% nos cinco ensaios realizados, respectivamente. Como está sendo demonstrado nesse estudo, existem muitos relatos na literatura demonstrando que a utilização de cloreto férrico na remoção de fósforo se mostra eficiente.

Figura 49. Concentração de fósforo (mg P/L) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

Tabela 22 - Eficiência de remoção de fósforo (%) nos tratamentos biológico e físico-químico.

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	10	-16	9	-22	-35	-11
Ef. de remoção L.A.	16	10	25	13	-10	11
Ef. de remoção UASB - Al ₂ (SO ₄) ₃	46	10	85	13	75	46
Ef. de remoção UASB - FeCl ₃	81	91	93	91	90	89
Ef. de remoção L.A.- Al ₂ (SO ₄) ₃	85	-1	34	69	-23	33
Ef. de remoção L.A. - FeCl ₃	91	75	89	75	86	83

Nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato

Nas análises de nitrogênio total NTK os maiores valores são referentes ao afluente bruto e ao tratamento em reator UASB. Observando os resultados de nitrito e nitrato (Tabelas 23 e 24) percebe-se que o nitrogênio amoniacal (Figura 50) na presença do oxigênio do sistema de lodo ativado esta sendo oxidado para nitrito e nitrato pelo processo de nitrificação. A diminuição da concentração do nitrogênio amoniacal e o aumento das concentrações de nitrito e nitrato no sistema de lodo ativado também é um sinal de que a nitrificação esta ocorrendo de forma satisfatória

(Figura 50). Como também foi discutido anteriormente, o consumo da alcalinidade no lodo ativado pode ter relação direta o processo de nitrificação (Figura 51).

Figura 50. Nitrogênio total - NTK (mg/L) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

Figura 51. Nitrogênio amoniacal (mg/L) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

O fato de o nitrito ser o elemento intermediário da oxidação da amônia e o nitrato o produto final dessa oxidação justifica seus valores próximos a zero encontrados no esgoto bruto (Tabela 23 e 24).

Tabela 23 - Concentração de Nitrito (mg/L) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

Amostra/Ensaios	1º	2º	3º	4º	5º
Bruto	0	0	0	0	0,114
UASB	0	0	0	0	0
Lodo Ativado	0	6,5	1,26	6,29	10,17
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	0,057	0	0	0	0,39
UASB - FeCl_3	0	0	0	0	0
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	8,44	7,38	1,7	6,12	11,34
Lodo Ativado - FeCl_3	8,19	7,23	1,6	6,19	11,25

Tabela 24 - Concentração de Nitrato (mg/L) no esgoto bruto e nos efluentes dos tratamentos nos cinco ensaios realizados.

Amostras/Ensaios	1º	2º	3º	4º	5º
Bruto	0,247	0	0,07	0	0,125
UASB	0,299	0	0,122	0	0,454
Lodo Ativado	0	9,13	29,6	14,74	16,78
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	0,278701	0	0,1	0,153	0
UASB - FeCl_3	0,275	0	0	0,114	0
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	22,55	10,32	35,16	14,48	15,19
Lodo Ativado - FeCl_3	22,13	10,57	25,87	15,13	15,37

5.2.2. Ensaios parasitológicos e microbiológicos

Cistos de Giardia spp. e oocistos Cryptosporidium spp.

Em relação aos cistos de *Giardia* spp. (Tabela 25 e Figura 52), as maiores concentrações foram encontradas no afluente bruto no segundo e quinto ensaios com os valores de $5,8 \times 10^3$ e $1,38 \times 10^4$ cistos/L, respectivamente. Esses ensaios foram os que apresentaram as maiores remoções na ordem de 2 log, 10^4 a 10^2 cistos/L, entre o afluente bruto e o sistema de lodo ativado. Nos ensaios de Jar Test não foram obtidos resultados significativos quanto à remoção de *Giardia* spp.

No tratamento físico-químico do efluente do reator UASB observou-se a redução de 1 log quando se usou o sulfato de alumínio no primeiro, segundo, terceiro e quarto ensaios e 2 log para o quinto ensaio. Para o cloreto férrico a redução foi de 1 log para o primeiro, terceiro e quarto ensaios e 2 log para o segundo e quinto ensaios. No tratamento de lodo ativado com sulfato de alumínio a redução foi de 1 log para o terceiro e quarto ensaios. Para o cloreto férrico a redução foi mais expressiva no terceiro e quarto ensaios (Tabela 25).

Figura 52. Cistos de *Giardia* spp. nos cinco ensaios realizados

Tabela 25 - Infectividade de cistos de *Giardia* spp. (cistos/L) nos cinco ensaios.

Ensaio/Amostragem		Bruto	UASB	L.A.	UASB Al ₂ (SO ₄) ₃	UASB - FeCl ₃	L.A. Al ₂ (SO ₄) ₃	L.A. FeCl ₃
1º	Cistos/L	5,8 x 10 ³	3,8 x 10 ³	4,67 x 10 ²	2,29 x 10 ²	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	1,2 x 10 ²
	Inf.(%)	75,9	63,2	71,4	50	80	100	66,7
2º	Cistos/L	1,44 x 10 ⁴	1,04 x 10 ⁴	6,67 x 10 ²	1,727 x 10 ³	6,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²	6,67 x 10 ²
	Inf.(%)	73,6	53,8	60	57,9	44,4	83,3	88,9
3º	Cistos/L	7,2 x 10 ³	9,0 x 10 ³	2,733 x 10 ³	4,67 x 10 ²	3,5 x 10 ²	4,8 x 10 ²	5,0 x 10 ²
	Inf.(%)	80,6	80	90,2	42,8	57,1	66,7	100

4º	Cistos/L	$8,8 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$	$1,067 \times 10^3$	$6,40 \times 10^2$	$1,71 \times 10^2$	$2,86 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
	Inf.(%)	61,4	59,4	68,8	33,3	33,3	40	66,7
5º	Cistos/L	$1,38 \times 10^4$	$1,02 \times 10^4$	$9,33 \times 10^2$	$9,60 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$
	Inf.(%)	81,1	58,8	85,7	50	71,4	81,8	100

Analisando os resultados de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nota-se que em apenas três tratamentos em diferentes ensaios foi detectada a presença de oocistos. Para os tratamentos físico-químicos não foram encontrados oocistos (Tabela 26).

Tabela 26 - Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (oocistos/L) nos cinco ensaios realizados.

Amostras/Ensaio	1º	2º	3º	4º	5º
Bruto	ND	200	ND	ND	ND
UASB	ND	ND	ND	200	ND
Lodo Ativado	ND	67	ND	ND	ND
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	ND	ND	ND	ND	ND
UASB - FeCl_3	ND	ND	ND	ND	ND
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	ND	ND	ND	ND	ND
Lodo Ativado - FeCl_3	ND	ND	ND	ND	ND

Nota: ND: Não detectado

Coliformes totais e *Escherichia coli*

Visualizando os valores de coliformes totais (Tabela 27, Figura 53 e 54), nota-se uma expressiva remoção na ordem de 10^2 e 10^3 entre o afluente bruto e o tratamento com lodo ativado. Observa-se que, em geral, na maioria dos tratamentos a eficiência de remoção foi acima de 90%, exceto para o tratamento do efluente do reator UASB no segundo, quarto e quinto ensaios. Se os resultados de coliformes totais forem utilizados como indicador da eficiência do tratamento, mesmo sem a etapa de desinfecção instalada, observa-se uma boa eficiência de remoção.

Figura 53. Gráficos das Concentrações de coliformes totais (UFC/mL) nos cinco ensaios realizados.

Figura 54. Concentração de coliformes totais (UFC/mL) nos cinco ensaios realizados.

Tabela 27 - Eficiência de remoção de coliformes totais (%) nos tratamentos

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	93,8	78,1	99,1	53,8	55,9	76,1
Ef. de remoção L.A.	98,9	97,6	99,9	99,8	99,7	99,2
Ef. de remoção UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	97,8	91,9	99,9	30,8	94,1	82,9
Ef. de remoção UASB - FeCl_3	98,3	90,6	99,9	--	85,3	93,5
Ef. de remoção L.A. - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	99,4	98,4	100,0	92,3	99,7	98,0
Ef. de remoção L.A. - FeCl_3	99,9	99,1	99,9	96,2	100,0	99,0

Tabela 28 - Concentração de coliformes totais (UFC/mL) nos cinco ensaios realizados.

Amostras/Ensaio	1º	2º	3º	4º	5º
Bruto	$4,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$
UASB	$2,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	5×10^4	$6,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
Lodo Ativado	$4,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	$9,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
UASB - FeCl_3	$7,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	$3,7 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	$2,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$
Lodo Ativado - FeCl_3	$4,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$

A eficiência de remoção de *Escherichia coli* no efluente do reator UASB em relação ao esgoto bruto foi, em média, de 77 % para o tratamento sem coagulante, 94,3% para o tratamento com sulfato de alumínio e 90,3% para cloreto férrico . A eficiência de remoção no efluente do lodo ativado foi, em média, de 97,4% para o tratamento sem coagulante, 97,9% para o tratamento com sulfato de alumínio e 98,6% para cloreto férrico. As maiores eficiências, tanto para efluente do reator UASB quanto para o efluente do lodo ativado, foram obtidas no terceiro ensaio, que resultaram na remoção de 100% em todos os tratamentos, exceto para o tratamento UASB sem coagulante (Tabela 28, Figura 55 e 56).

Figura 55. Gráficos das concentração de *Escherichia coli* (UFC/mL) nos cinco ensaios realizados.

Figura 56. Concentração de *Escherichia coli* (UFC/mL) nos cinco ensaios realizados.

Tabela 29 - Concentração de *Escherichia coli* (UFC/mL) nos cinco ensaios realizados.

Amostras/Ensaio	1º	2º	3º	4º	5º
Bruto	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$
UASB	$8,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$3,7 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$
Lodo Ativado	$1,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	$1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$8,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
UASB - FeCl_3	$1,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	$1,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	5	$6,0 \times 10$	$7,0 \times 10$
Lodo Ativado - FeCl_3	$2,0 \times 10$	$1,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$3,0 \times 10$	$2,0 \times 10$

Tabela 30 - Eficiência de remoção de (%) *Escherichia coli* nos tratamentos

Tratamento/Ef. Remoção	1º	2º	3º	4º	5º	Média
Ef. de remoção UASB	73,3	45,0	99,3	87,2	80,0	77,0
Ef. de remoção L.A.	99,5	88,5	100,0	99,7	99,5	97,4
Ef. de remoção UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	96,7	85,0	100,0	99,7	90,0	94,3
Ef. de remoção UASB - FeCl_3	96,7	65,0	100,0	99,8	90,0	90,3
Ef. de remoção L.A. - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	99,6	90,5	100,0	100,0	99,7	97,9
Ef. de remoção L.A. - FeCl_3	99,9	93,0	100,0	100,0	99,9	98,6

Micro e macro nutrientes

Analisando os resultados de micro e macronutrientes nos dois ensaios realizados (Tabelas 31 e 32), observa-se que não houve variações expressivas nas concentrações entre os ensaios. As maiores concentrações obtidas foram de ferro total que atingiu valor máximo de 3,252 mg/L para o tratamento do efluente do reator UASB com cloreto férrico, cálcio com 45,15 mg/L para o tratamento do efluente do lodo ativado com sulfato de alumínio, potássio com 33,0 mg/L para o tratamento do efluente do reator UASB sem coagulante e sódio com 62 mg/L para o esgoto bruto.

Tabela 31 - Concentração de micro e macronutrientes (mg/L) no ensaio realizado no dia 10 de novembro de 2011.

Parâmetros	Esgoto Bruto	Esgoto UASB	L.A.	UASB $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	UASB FeCl_3	L.A. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	L.A. FeCl_3
Zinco (mgZn . L ⁻¹)	0,157	0,124	0,117	0,077	0,033	0,067	0,044
Chumbo (mgPb . L ⁻¹)	0,13	0,12	0,14	0,14	0,08	0,08	0,10
Cádmio (mgCd . L ⁻¹)	0,055	0,072	0,075	0,071	0,034	0,021	0,013
Níquel (mg Ni . L ⁻¹)	0,070	0,108	0,093	0,088	0,010	<0,008	0,011

Ferro total	(mgFe . L ⁻¹)	2,155	1,557	0,632	0,342	3,252	0,338	2,636
Manganês total	(mgMn . L ⁻¹)	0,042	0,042	0,035	0,038	0,070	0,033	0,041
Cobre	(mgCu . L ⁻¹)	0,045	<0,003	0,006	0,012	0,008	<0,003	<0,005
Cromo total	(mgCr . L ⁻¹)	<0,005	0,008	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Alumínio	(mgAl . L ⁻¹)	1,57	0,75	0,22	2,68	0,03	1,44	<0,01
Boro	(mgB . L ⁻¹)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cálcio	(mgCa . L ⁻¹)	32,14	38,51	36,62	34,66	33,15	45,15	42,70
Potássio	(mgK . L ⁻¹)	31,0	33,0	27,0	31,7	31,7	27,2	26,0
Sódio	(mgNa . L ⁻¹)	44,0	62,0	41,0	43,0	45,0	48,0	42,0
Magnésio	(mgMg . L ⁻¹)	4,27	3,88	4,07	4,10	4,17	4,24	3,92

Apesar dessas concentrações, analisando a Resolução CONAMA 375/2005 que se referente as características do corpos d'água, algumas variáveis apresentaram características de rio classe 1, como é o caso do zinco (exceto para o ensaio realizado em 09/12/11), manganês, cromo e boro. As demais variáveis se apresentaram acima dos valores máximos permitidos pela Resolução CONAMA 375/2005 quando comparadas as características de rio classe 1. No entanto, as concentrações de cálcio, potássio e magnésio encontradas podem ser de grande valia para o reuso agrícola, uma vez que esses elementos são essenciais para o crescimento das plantas. A concentração de sódio apresenta valores que devem ser levados em consideração quanto ao reuso agrícola, devido à possibilidade de o uso por longos períodos causar a salinização e consequentemente a degradação do solo.

Tabela 32. Concentração de micro e macronutrientes (mg/L) no ensaio realizado no dia 9 de dezembro de 2011.

Parâmetros		Esgoto Bruto	Esgoto UASB	L.A.	UASB Al ₂ (SO ₄) ₃	UASB FeCl ₃	L.A. Al ₂ (SO ₄) ₃	L.A. FeCl ₃
Zinco	(mgZn . L ⁻¹)	1,228	0,737	0,05	0,006	0,543	1,574	1,588
Chumbo	(mgPb . L ⁻¹)	0,14	0,16	0,10	0,05	0,22	0,14	0,08
Cádmio	(mgCd . L ⁻¹)	0,029	<0,0006	0,013	0,024	0,022	0,08	<0,0006
Níquel	(mg Ni . L ⁻¹)	0,060	<0,008	<0,008	<0,008	0,025	<0,008	<0,008
Ferro total	(mgFe . L ⁻¹)	0,802	1,101	0,155	0,514	2,169	0,773	2,008
Manganês total	(mgMn . L ⁻¹)	0,010	0,026	0,019	0,018	0,033	0,031	0,038

Cobre	(mgCu . L ⁻¹)	0,024	0,034	<0,003	<0,003	0,012	0,043	0,018
Cromo total	(mgCr . L ⁻¹)	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Alumínio	(mgAl . L ⁻¹)	0,5	0,88	0,08	1,5	0,94	1,42	0,33
Boro	(mgB . L ⁻¹)	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
Cálcio	(mgCa . L ⁻¹)	25,50	28,70	33,64	39,18	29,77	37,65	40,42
Potássio	(mgK . L ⁻¹)	17,8	25,0	23,3	24,9	25,4	23,7	22,4
Sódio	(mgNa . L ⁻¹)	36,3	57,0	51,4	58,5	56,7	51,4	49,5
Magnésio	(mgMg . L ⁻¹)	1,857	2,304	2,261	2,333	2,309	2,270	2,235

Sólidos

Serão apresentados nesse tópico apenas os resultados referentes a sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) devido à incoerência dos resultados obtidos nas análises de sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais voláteis (STV). Analisando os resultados de sólidos suspensos (Figuras 57 e 58, e Tabela 33), observa-se que a maior fração corresponde à fração orgânica de SSV.

Figura 57. Concentração de sólidos suspensos totais nos cinco ensaios realizados.

Figura 58. Concentração de sólidos suspensos voláteis e sólidos suspensos fixos nos cinco ensaios realizados.

Tabela 33. Concentração de sólidos suspensos totais, fixos e voláteis nos cinco ensaios realizados (mg/L)

Tratamento/Ensaio	Sólidos Suspensos Totais				
	1º	2º	3º	4º	5º
Esgoto bruto	234,74	131,40	357,81	129,13	122,47
Esgoto UASB	51,87		162,60	103,53	92,65
Esgoto tanque de aeração	270,00	153,93	558,83	292,31	351,90
Esgoto lodo ativado	19,40		43,40	42,27	28,80
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	28,53	41,38	28,00	31,40	43,13
UASB - FeCl_3	15,00	31,20	20,37	19,80	26,13
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	16,20	26,84	25,04	19,70	22,00
Lodo Ativado - FeCl_3	10,07	22,80	12,80	15,33	13,93
Tratamento/Ensaio	Sólidos Suspensos Fixos				
	1º	2º	3º	4º	5º
Esgoto bruto	30,37	8,40	43,90	12,73	8,60
Esgoto UASB	2,47		20,07	11,67	8,57
Esgoto tanque de aeração	37,20	15,20	90,37	39,94	45,28
Esgoto lodo ativado	0,20		4,20	3,40	1,60
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	5,93	9,17	8,77	7,47	10,87
UASB - FeCl_3	1,00	7,47	7,33	3,25	4,33
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	16,20	4,84	5,50	1,55	1,07
Lodo Ativado - FeCl_3	10,07	8,49	4,73	6,27	2,27

	Sólidos Suspensos Voláteis				
Esgoto bruto	204,37	123,00	313,90	116,40	113,87
Esgoto UASB	49,40		142,53	91,87	84,08
Esgoto tanque de aeração	232,80	151,00	468,47	252,36	306,62
Esgoto lodo ativado	19,20		39,20	38,87	27,20
UASB - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	22,60	37,90	19,23	23,93	32,27
UASB - FeCl_3	14,00	23,73	13,03	16,55	21,80
Lodo Ativado - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	14,67	22,00	19,54	18,15	20,93
Lodo Ativado - FeCl_3	7,87	14,31	8,07	9,07	11,67

5.3 Resultados 3 etapa – protozoários e estrogenicidade

5.3.1 Monitoramento de variáveis físicas e químicas

Foram realizadas 7 análises no total, sendo 5 delas com o sistema de lodos ativados estabilizados em sistema de aeração prolongada e 2 com sistema em fase de estabilização, para o sistema de lodos ativados convencional. Estas duas últimas análises foram realizadas sem que o sistema estivesse em equilíbrio. Isso ocorreu pelo curto espaço de tempo para realizar as análises e também para avaliar os parâmetros analisados nesses casos. Os resultados do monitoramento das variáveis físico-químicas estão apresentados nas tabelas 34 e 35. A seguir serão discutidos os parâmetros mais relevantes.

pH

Em processos anaeróbios, o pH ótimo depende do tipo de microrganismo e do substrato; bactérias acidogênicas têm crescimento ótimo na faixa de pH de 5,0 a 6,0, enquanto que bactérias metanogênicas, entre 6,6 e 7,4 (CHERNICHARO, 2007).

Os valores encontrados permaneceram próximos à neutralidade em todas as etapas do processo de tratamento, fazendo com que não afete as condições normais de equilíbrio do sistema. O pH no sistema variou entre 6,5 e 6,8. No entanto, quando o sistema de lodos ativados foi operado em modo convencional obteve uma média de pH de 5,8, o que também era esperado.

Tabela 34 - Resumo estatístico dos dados durante o monitoramento da ETE –Piloto para o afluente bruto, efluente do reator UASB e do sistema de lodos ativado (aeração prolongada).

Parâmetros	Afluente Bruto (AB)					Efluente UASB (EU)						Efluente lodo ativado - Aeração Prolongada (EA)						
	Nº Amostra	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Nº Amostra	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Eficiência média de remoção (EB+EU)		Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Eficiência média de remoção (EU+EA)	Eficiência média de remoção (EB+EU+EA)
pH	7	6,5	0,2	6,1	6,8	7	6,6	0,1	6,5	6,8		5	6,6	0,4	6,1	7,0		
AP (mg CaCO ³ .L ⁻¹)	7	95	54	44	187	7	134	52	89	224		5	62	38	18	98		
AT (mg CaCO ³ .L ⁻¹)	7	183	90	103	331	7	207	85	153	343		5	89	54	23	130		
Turbidez (NTU)	7	101	17	77	126	7	56	12	40	74	44	5	6	3	4	11	89	
CE (µs/cm)	7	520	100	365	639	7	512	60	434	593		5	438	61	373	521		
Temperatura (°C)	7	25,4	1,8	23,1	28,1	7	26,0	1,6	24,0	28,5		5	25,0	1,3	23,8	27,0		
Cor ⁽¹⁾ (PtCo)	4	1172	212	976	1400	4	568	156	440	788	52	3	130	49	87	184	77	
Dureza (mg CaCO ³ .L ⁻¹)	3	75	15	58	86	3	62	9	54	72	17	2	47	23	22	68	23	
DQO (mg/L)	7	116	44	61	161	7	87	51	26	150	24	5	35	21	21	71	60	
DBO (mg/L)	3	177	23	156	202	3	74	5	68	77	58	2	27		27	27	64	
ST	6	444	200	288	821	6	269	49	222	337	39	4	236	25	206	267	12	47
SFT	6	154	76	62	292	6	139	43	69	201	10	4	137	20	116	163	1	11
SVT	6	290	194	139	665	6	130	54	53	205	55	4	100	21	80	129	24	66
SST	6	102	16	76	125	6	42	15	22	64	59	4	11	7	5	21	74	89
SSF	6	13	4	6	18	6	5	2	1	7	63	4	1	0	1	1	87	95
SSV	6	89	12	69	105	6	37	14	21	59	58	4	10	7	5	20	72	88
OD (mg/L)												5	2,4	0,2	2,2	2,7		

Nota: (1): Cor aparente em absorvância 455 nm; AP: Alcalinidade parcial; AT: Alcalinidade total; CE: Condutividade elétrica; DQO: Demanda química de oxigênio; DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; ST: Sólidos totais, SFT: Sólidos Fixos Totais; SVT: Sólidos Voláteis Totais; SST: Sólidos Suspensos Totais; SSF: Sólidos Suspensos Fixos; e SSV: Sólidos Suspensos Voláteis; e OD: Oxigênio dissolvido no tanque de aeração.

Tabela 35 - Resumo estatístico dos dados durante o monitoramento da ETE –Piloto para o efluente do sistema de lodos ativado (convencional em estabilização) e do efluente do filtro em areia.

Parâmetros	Efluente Lodo Ativado - Convencional em Estabilização (EA1)						Efluente Filtro de Areia (EF)						
	Nº Amostra	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Eficiência média de remoção (EU+EA1)	Nº Amostra	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Eficiência média de remoção (EA+EF)	Eficiência média global do sistema
pH	2	5,8	0,9	5,1	6,4		7,0	6,8	0,7	5,7	7,4		
AP (mg CaCO ³ .L ⁻¹)	2	27	38	0	53		7	60	44	0	115		
AT (mg CaCO ³ .L ⁻¹)	2	41	51	5	77		7	85	58	9	160		
Turbidez (UNT)	2	25	5	21	28	56	7	1,1	0,3	0,7	1,5	82	99
CE (µs/cm)	2	473	43	442	503		7	443	70	319	528		15
Temperatura (°C)	2	25,2	1,8	23,9	26,5		7	25	2,06	24	29		
Cor ⁽¹⁾ (PtCo)	1	348		348	348	39	4	59	14	45	76	55	95
Dureza (mg CaCO ³ .L ⁻¹)	1	54		54	54	13	3	54	8	49	64	-15	27
DQO (mg/L)	2	34		34	34	61	7	16	15	7	50	54	86
DBO (mg/L)	1	39		25	53	47	3	16	9	3	23	42	91
ST	1	400		400	400								
SFT	2	74	34	50	98	47							
SVT	1	350		350	350								
SST	2	38	20	24	52	9							
SSF	2	3	1	3	4	29							
SSV	2	35	19	21	48	6							
OD	2	2,6	0,0	2,6	2,6								

Nota: (1): Cor aparente em absorbância 455 nm; AP: Alcalinidade parcial; AT Alcalinidade total; CE: Condutividade elétrica; DQO: Demanda química de oxigênio; DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; ST: Sólidos totais, SFT: Sólidos Fixos Totais; SVT: Sólidos Voláteis Totais; SST: Sólidos Suspensos Totais; SSF: Sólidos Suspensos Fixos; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis; e OD: Oxigênio dissolvido no tanque de aeração.

Alcalinidade

Para reatores anaeróbios, o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis pode representar desequilíbrio no sistema ao indicar baixa atividade de arqueas metanogênicas. Dessa forma, relação entre alcalinidades intermediária e parcial superior a 0,3 pode indicar distúrbios no processo anaeróbio. Porém, a estabilidade do processo pode ocorrer em valores diferentes de 0,3 (CHERNICHARO, 2007).

Observa-se que o reator UASB gerou uma baixa alcalinidade comparada com o esgoto bruto, isso se confirma com os valores obtidos de pH que praticamente não aumentaram. A relação entre alcalinidade intermediária e parcial (AI/AP) está ilustrada na Figura 59. As relações AI/AP encontradas na presente pesquisa variaram de 0,38 a 0,72, em alguns casos ultrapassaram o valor de 0,3. No entanto, não foi observado distúrbios relacionados à estabilidade do sistema.

Figura 59. Relação entre alcalinidade intermediária e parcial (AI/AP) no efluente do reator UASB.

Turbidez

Esta variável física foi monitorada com o intenção de associá-la à concentração e à remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.. A remoção do sistema ocorreu de forma satisfatória, atingindo 99% de remoção na saída do filtro de areia. Os maiores percentuais de remoção da turbidez ocorreram no sistema de lodos ativados, comprovando uma boa sedimentabilidade dos

flocos. A eficiência global dos sistema até o filtro de areia foi de 99% tendo uma média de 1,1 UNT, o que representa uma alta remoção.

Cor

A eficiência de remoção da cor aparente entre o afluente e o filtro de areia foi de 95%, com valores variando de 1400 a 45 PtCo.

Dureza

Segundo Roloff (2006), a classificação das águas, em termos de dureza, com base na concentração em mg/L de CaCO_3 é a seguinte:

- Dureza < 50 mg/L CaCO_3 : água mole
- Dureza entre 50 e 150 mg/L CaCO_3 - água com dureza moderada
- Dureza entre 150 e 300 mg/L CaCO_3 - água dura
- Dureza > 300 mg/L CaCO_3 - água muito dura

Analisando os resultados obtidos, a dureza variou entre 47 e 75 mg/L de CaCO_3 , o que classifica os efluentes do sistema em dureza moderada.

Demanda Química de Oxigênio

A DQO no afluente bruto atingiu o valor máximo de 161 mg/L. Comparando esses resultados e comparando com os valores obtidos na primeira etapa constata-se expressiva diminuição desses valores. Essa diminuição pode ser explicada pelo fato do esgoto da ETE-piloto analisado na primeira etapa ser apenas da rede do campus universitário. Sendo que, na segunda etapa das análises houve a abertura da comporta que liga a rede do bairro com a do campus, mudando as características do afluente. A eficiência de remoção do sistema de 86% pode ser explicada pela baixa remoção do reator UASB que foi de 24%. Possivelmente o curto tempo de estabilização do reator não foi suficiente para o crescimento de uma manta de lodo com maior potencial de remoção.

Sólidos

As análises de sólidos suspensos totais no tanque de aeração do sistema de lodos ativados resultaram em uma média de 550 mg/L, o que

representa um valor abaixo do ideal para o sistema. Apesar do baixo valor, o sistema se comportou de maneira satisfatória com relação à eficiência de remoção dos sólidos, o que justifica os baixos valores de turbidez registrados. Os valores de remoção média do sistema registrados na saída do decantador foi de 47% para sólidos totais e 89% para sólidos suspenso totais. No entanto, após a mudança do sistema de lodos ativados com aeração prolongada para o sistema convencional, foi observado um grande arraste dos sólidos no efluente. Esses valores foram da ordem de 400 mg/L para sólidos totais, o que resultou na perda da biomassa presente no tanque de aeração.

5.3.2 Monitoramento microbiológico do sistema de tratamento

5.3.2.1 Microrganismos indicadores

As figuras 60 e 61 ilustram as concentrações de coliformes totais e *Escherichia coli* nas unidades de tratamento.

Figura 60. Concentração de *Escherichia coli* nas unidades de tratamento da ETE-piloto. Nota: L.A.: Sistema de lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Figura 61. Concentração de coliformes totais nas unidade de tratamento da ETE-piloto. Nota: L.A.:Sistema de lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Como era de se esperar, foram constatadas elevadas concentrações dos indicadores de contaminação fecal: *E. coli* e coliformes totais no esgoto bruto. As médias geométricas foram de $6,83 \times 10^4$ e $2,83 \times 10^5$ por mL, respectivamente. Keller et al. (2004) encontraram uma média geométrica de 1×10^7 por 100 mL para *E. coli* em esgoto bruto. Enquanto Kistemann et al. (2008) encontraram concentrações médias para esgoto bruto de 0,3 a $1,3 \times 10^7$ para *E. coli* por 100 mL e 1,2 a $6,4 \times 10^7$ para coliformes totais por 100 mL. Medeiros (2013) obteve em amostras de esgoto bruto valores de $1,2 \times 10^6$ por mL para *E. coli* e para coliformes totais $5,0 \times 10^4$ por mL. Em estudo realizado por Oliveira e Von Sperling (2005) em 116 estações de tratamento de esgoto, o valor médio para coliformes fecais obtido foi de $9,4 \times 10^7$ em 100 mL.

No efluente do reator UASB também foram verificadas altas concentrações de *E. coli* e coliformes totais, com respectivas médias geométricas de $3,05 \times 10^4$ por mL e $1,03 \times 10^5$. Oliveira e Von Sperling (2005) relatam valores entre 4×10^6 e 7×10^7 coliformes fecais em 100 mL para

efluentes de 10 reatores UASB em operação no país. Keller et al. (2004) encontraram uma média geométrica de 2×10^6 por 100 mL para *E. coli*. Elevadas concentrações também foram encontradas por Medeiros (2013) no efluente do reator UASB, com médias geométricas de $1,5 \times 10^5$ de coliformes totais por mL e $1,4 \times 10^4$ de *E. coli* por mL.

No sistema de lodos ativados foram obtidas médias geométricas de $1,54 \times 10^3$ e $4,48 \times 10^2$ para *E. coli* e coliformes totais, respectivamente. Já Medeiros (2013) obteve: coliformes totais de $1,1 \times 10^4$ por mL e *E. coli*, $3,6 \times 10^2$ por mL. Noah et al. (2003) encontraram concentrações de coliformes totais de 3×10^5 em sistema de lodos ativados. Oliveira e Von Sperling (2005) relatam valores entre 3×10^4 e 3×10^5 coliformes fecais em 100 mL para efluentes de 13 ETEs com sistema de lodos ativados em operação no país. Chong et al. (2012) descrevem que efluentes de lodos ativados operados após reatores UASB conseguiram remoção média de 2,5 log, com efluente final contendo 9×10^4 coliformes fecais por 100 ml de amostra.

No efluente do filtro de areia de areia foram encontrados os seguintes valores: $5,17 \times 10^1$ para *E. coli* e $1,49 \times 10^2$ para coliformes totais. Medeiros (2013) obteve uma remoção de aproximadamente 0,25 log tanto para *E. coli* quanto para coliformes totais em filtros de areia com taxa de aplicação de $4,26 \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{d}$.

Na tabela 36 estão apresentadas as remoções médias em log de *E. coli* e coliformes totais encontradas nas etapas de tratamento.

Tabela 36 - Remoção de coliformes totais e *Escherichia coli* na unidades da ETE-piloto.

		UASB	Lodos Ativados	Filtro de Areia
	Nº amostra	Log removido ⁽¹⁾	Log removido ⁽¹⁾	Log removido ⁽¹⁾
Coliformes totais	7	0,43	1,82	1,01
<i>Escherichia coli</i>	7	0,35	1,83	0,93

nota: (1) média de remoção em log.

5.3.2.2 *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

As concentrações de cistos de *Giardia* spp. encontradas durante o tratamento estão ilustradas na Figura 62.

Figura 62. Concentração de cisto de *Giardia* spp. nas unidades de tratamento da ETE-piloto.

Nota: L.A.: lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Segundo ensaios realizados por Medeiros (2013), a recuperação de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. utilizando ColorSeed® foi de, respectivamente, 85 e 20% em esgoto bruto, e 62,5 e 17,5% em efluente tratado, quando utilizado o método de tripla centrifugação. Cabe aqui ressaltar que nas análises realizadas nesta pesquisa não foi possível realizar os ensaios de recuperação com o kit ColorSeed® devido ao custo elevado e ao prazo longo para entrega do produto, que é importado. No entanto, foram realizados três ensaios de controle negativo pra avaliar e não houve contaminação no transcorrer do procedimento de análise. O controle negativo foi realizado com amostras da água deionizada, ausente de protozoários, utilizada nos ensaios, ao invés de amostra de esgoto.

Analisando os resultados, observa-se com clareza que a recuperação de (oo)cisto de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas amostras de esgoto bruto não ocorreu de forma satisfatória. Nas 7 análises realizadas nesta etapa, apenas uma contagem de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto foi

superior as contagens em amostras de efluente do reator UASB. Por ser um método com muitos detalhes e que exige técnica desde a preparação das amostras até a identificação dos (oo)cistos, as taxas de recuperação podem variar.

Apesar de uma possível baixa taxa de recuperação nas amostras de esgoto bruto, todas as amostras analisadas foram positivas para cistos de *Giardia* spp.. No esgoto bruto foram encontradas concentrações de cistos de *Giardia* spp. com média geométrica de $1,22 \times 10^4$ cistos por litro. Conforme relato, a média geométrica obtida para o tratamento por reator UASB foi de $1,79 \times 10^4$ cistos por litro. Comparando os resultados do esgoto bruto com o esgoto do reator UASB pode-se observar um aumento médio de 0,12 em termos de log. Para o tratamento de lodos ativados os resultados das concentrações foram de $1,19 \times 10^3$ cistos de *Giardia* spp. por litro.

As remoções de cistos de *Giardia* spp. conseguidas através do tratamento biológico promovido pelo reator UASB e sistema de lodos ativados podem ser visualizadas na tabela 37.

Tabela 37 - Concentração e remoção de cistos de *Giardia* spp. nos tratamentos.

Efluente	Nº amostra	Média geométrica de cistos/L	Remoção (Log)
Bruto	7	$1,33 \times 10^4$	
UASB	7	$1,79 \times 10^4$	-0,12
Lodo Ativado	7	$1,19 \times 10^3$	1,17
Filtro de areia	7	0	3,07

Como era esperado, para o tratamento com filtros de areia atingiu-se uma remoção de 100% dos cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., não sendo detectados em nenhuma das análises. Essa situação se repetiu para os oocistos de *Cryptosporidium* spp. no tratamento com lodos ativados, não sendo detectados nenhum oocistos nas análises.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram encontrados em 11 do total das 28 amostras analisadas, representando um percentual de 39%. A tabela 38 ilustra as concentrações médias em cada tratamento.

Tabela 38 - Percentual de oocistos de *Cryptosporidium* spp. encontrados nos tratamentos e médias geométricas.

Efluente	Nº amostra	Percentual de oocistos nas amostras	Média geométrica de oocistos/L
Bruto	7	85%	$1,32 \times 10^2$
UASB	7	71%	$2,24 \times 10^2$
Lodo Ativado	7	0%	-
Filtro de areia	7	0%	-

Foram encontradas concentrações variando de 88 a 800 oocistos/L. Essa faixa ficou próxima de 80 a 912 oocistos de *Cryptosporidium* por litro, a mesma encontrada por Farias et al. (2002). No entanto, um pouco superior aos resultados de Montemayor et al. (2005), os quais relatam média de 103 a 139 oocistos/L em esgoto bruto e de 1,8 a 5,6 oocistos por litro em efluente tratado por lodos ativados em cinco ETEs na Espanha.

Na literatura constam taxas variáveis de eficiência do lodo ativado na remoção de (oo)cistos. Carraro et al. (2000) e Payment et al. (2001) relatam uma taxa de remoção de cistos de *Giardia* spp. de 79% e 74%, respectivamente. Bukhari et al. (1997) ao avaliarem 3 estações de tratamento de esgoto, obtiveram taxas de remoção de cistos variando de 26% a 71%.

Santos (2007) detectou cistos de *Giardia* spp. em 13 das 14 amostras de afluente com uma média aritmética de $1,214 \times 10^5$ cistos/L e em todas as amostras de efluente, com média de $1,903 \times 10^3$ cistos/L. Bonatti et al. (2007) reportaram amostras de efluente de lodos ativados contaminadas por *Giardia* spp. ($1,0 \times 10^3$ cistos/L) e *Cryptosporidium* ($3,6 \times 10^3$ oocistos/L).

A alta concentração de cistos de *Giardia* spp. presente no esgoto reflete a incidência desse parasito na população (OTTOSON et al., 2006; CHENG et al., 2009; NASSER et al., 2012) e pode ser explicada pelo fato da giardiase ser endêmica no Brasil (BONATTI et al., 2007). Apesar de não existir nenhum dado oficial de surto no país, há estudos que revelam alta prevalência deste parasito na população, principalmente em áreas com condições sanitárias precárias (RAZZOLINI et al., 2011).

Os relatos do presente estudo e da literatura reforçam a necessidade do monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporium* spp. em

amostras de esgoto.

5.3.3. Ensaio de desinfecção

Os resultados obtidos no ensaio de cloração por tanque de contato para o efluente do filtro de areia estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39 - Resultados do ensaio de desinfecção por cloração em tanque de contato para o efluente do filtro de areia.

Variáveis	Bruto ⁽¹⁾	Dosagens (mg/L)					
		0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	6,0
Cloro residual livre (mg/L)	nr	0,1	0,1	0,5	0,2	0,3	3,2
Cloro residual combinado (mg/L)	nr	0,2	0,7	1,1	2,4	3,2	2,1
Cloro residual total (mg/L)	nr	0,3	0,8	1,6	2,6	3,5	5,3
Coliformes totais (UFC/100mL)	668	558	490	248	193	73	47
<i>Escherichia coli</i> (UFC/100mL)	204	108	36	2	1,5	1	0

Nota: (1): Efluente bruto do filtro de areia; nr: não realizado.

Visualizando os resultados obtidos no ensaio de desinfecção observa-se uma eficiente remoção dos organismo indicadores. Se tomarmos por base o reuso de para irrigação de culturas que possam ser consumidas cruas, a USEPA (2012) exige a ausência de *E. coli*, quanto a OMS recomenda 1000 CF/100 ml. Para a irrigação de culturas que serão processadas e comercializadas (e.g. plantas forrageiras, etc) a orientação da USEPA (2012) é de 200 CF/100 mL.

A PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011, em seu Art. 13º, cita que após a desinfecção, a água de distribuição deve conter o teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/L, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L em qualquer ponto da rede de distribuição. Recomenda-se que o teor máximo de cloro residual livre, em qualquer ponto do sistema de abastecimento, seja de 2,0 mg/L. Analisando os resultados obtidos, a partir da dosagem de 2 mg/L o valor de cloro residual livre sempre foi superior ao exigido pela portaria. No entanto, a dosagem de 6 mg/L ultrapassa o valor máximo de 2m/L de cloro residual livre exigido.

Os resultados mais satisfatórios que foram obtivos estão na fase de dosagem entre 3 e 4 mg/L de cloro, o que resultou no cloro residual livre de 0,2 e 0,3 mg/L, respectivamente. As análises de parasitos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. não foram realizadas pelo fato de não foram detectados (oo)cistos no efluente do filtro de areia.

5.4.4 Teste de estrogenicidade em amostra de esgoto

O ensaio YES representa o potencial estrogênico de substâncias ou amostras testadas, podendo ser medido colorimetricamente pela mudança de cor do substrato cromogênico (CPRG) presente no meio reacional. O substrato é metabolizado pela enzima β -galactosidase, produzida como resposta à ligação da substância estrogênica no RE da levedura. Deste modo, quando uma substância estrogênica está presente no ensaio YES, a coloração do meio de análise muda de amarelo para rosa, como pode ser observado na Figura 63 (BILA, 2005).

Como apresentado na seção de Materiais e Métodos, a atividade estrogênica do esgoto equivalente ao 17 β -estradiol foi avaliada em amostras com preparo prévio, ou seja, com extração e concentração em EFS. Para medir a atividade estrogênica no ensaio YES, foi realizado o processo de extração das amostras de esgoto para concentração.

Figura 63. Mudança de coloração de amarela para rosa indicando estrogenicidade após 72 horas de incubação (fileiras A, C, F e G representa a curva padrão do 17 β -estradiol).

Foram realizados 7 ensaios de estrogenicidade entre o período de dezembro de 2013 e março de 2014. Os efluentes foram coletados nos seguintes pontos da ETE piloto:

- Efluente de esgoto bruto (EB);
- Efluente da saída do reator UASB (EU);
- Efluente da saída do sistema de lodos ativados (EL) e
- Efluente da saída do filtro de areia (EF).

Para cada um dos 7 ensaios foi gerada uma curva padrão de 17 β -estradiol na faixa de 54,48 $\mu\text{g. L}^{-1}$ a 26,61 ng. L^{-1} . A máxima indução da β -galactosidade foi de $2,980 \pm 0,68$, o limite de detecção foi de $1,389 \pm 0,23$, e o EC_{50} $4,25 \pm 1,43$. No entanto, não foi possível quantificar o valor do EC_{50} para nenhuma das curvas dose-resposta das amostras. Isso ocorreu porque todos os Y_{50} encontrados nas curvas dose-resposta foram menores que o limite de detecção da curva padrão de 17 β -estradiol. Nos resultados obtidos nenhuma das curvas dose-reposta aproximaram-se do resultado esperado para o teste YES, isto é, curva com formato sigmoidal.

Isso se deve possivelmente pela inibição do crescimento da levedura que ocasionou uma redução da resposta do teste YES à atividade estrogênica. Beck et al (2006) constataram que a inibição do crescimento geralmente é atribuída à provável presença de substâncias tóxicas nas amostras. Nestas amostras, pode-se observar uma relação inversa entre o crescimento da levedura e a atividade estrogênica, conforme apresentado na Figura 64. A inibição do crescimento da levedura foi controlado pela medida da absorbância

a 630 nm, comparada em relação ao crescimento da levedura no controle (solvente).

Figure 64. Relação entre atividade estrogênica e inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conforme apresentado por Beck et al (2006).

Para todas as amostras analisadas observou-se a ocorrência de toxicidade, o que resultou na inibição do crescimento da levedura. Nestas amostras, utilizou-se a relação apresentada por Frische et al (2009), que utilizam o controle da absorbância 630 nm como ferramenta para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido à toxicidade das amostras, conforme a relação:

$$\text{Toxicidade} = 1 - (\text{Abs}_{630\text{amostra}} / \text{Abs}_{630\text{branco}}) \quad (10)$$

É relevante ressaltar que a rede de esgoto que abastece a ETE-piloto possui vários laboratórios que ocasionalmente descartam substâncias que podem ser potencialmente inibidoras.

Ensaio 1

Na Figura 65 estão ilustrados os resultados para a curva padrão de 17 β -estradiol no formato sigmoidal, o que atende o esperado. Os resultados obtidos para essa curva foram: máxima indução da β -galactosidade resultou em 2,71, o limite de detecção em 1,10, o Y50 em 1,91 e o EC50 em 3,82 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

Esse ensaio apresentou vários problemas nas curvas dose-resposta do teste YES das amostras de esgoto bruto, efluente UASB, do sistema de lodos ativados e do filtro de areia. Nas figuras deste primeiro ensaio não houve a resposta de estrogenicidade esperada.

Analisando a Figura 66, nota-se que ambas as curvas, tanto da amostra de esgoto bruto quanto do efluente do reator UASB, representam uma típica inibição do crescimento da levedura. Observa-se que os quatro primeiros poços apresentaram as maiores inibição de crescimento no valor de 0,88 (88%) para as amostras do reator UASB na diluição de 1/8 (Tabela 40).

Tabela 40. Estimativa da toxicidade para amostras com inibição de crescimento da levedura no Ensaio 1.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Bruto	0,80	0,81	0,80	0,81	0,12							
UASB	0,85	0,85	0,86	0,88	0,85	0,13	0,00		0,00	0,01	0,01	0,01
L.A.												
F.A.	0,08	0,01	0,02				0,02	0,04	0,01	0,02		0,01

nota: L.A.: Lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Figura 65. Curva padrão do 17β-estradiol referente ao Ensaio 1.

Figura 66. Curvas dose-resposta das amostras de EB e EU relativas ao Ensaio 1.

Figura 67. Curvas dose-resposta das amostras de EL e EF relativas ao Ensaio 1.

No caso dos efluentes do lodo ativado e filtro de areia (Figura 67) pode-se observar uma inibição máxima de 0,8 (8%) em relação ao branco (somente etanol). Mesmo que nenhuma das curvas apresentasse condições de paralelismo, quando a curva dose-resposta apresentou um sinal ascendente foi traçada uma reta para tentar estimar o grau de estrogenicidade naquele ponto.

Ensaio 2

Na Figura 68 estão ilustrados os resultados para a curva padrão de 17 β -estradiol no formato sigmoidal, o que atende o esperado. Os resultados obtidos para essa curva foram: máxima indução da β -galactosidade resultou em 2,37, o limite de detecção em 1,76, o Y50 em 2,06 e o EC50 em 2,55 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

Tabela 41 - Estimativa da toxicidade para amostras com inibição de crescimento da levedura no Ensaio 2.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Bruto	0,08	0,04	0,06									
UASB	0,12	0,06	0,10	0,09	0,03					0,02	0,02	0,02
L.A.												
F.A.	0,01					0,01	0,01	0,02		0,03	0,03	

nota: L.A.: Lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Observa-se a partir da Tabela 41 e da Figura 69 que novamente as amostras mais concentradas foram as que resultaram na maior inibição do crescimento da levedura. Para as quatro curvas nesse ensaio o Y50 da curva dose-resposta estimada foi menor que o limite de detecção, o que comprometeu o cálculo do EC50 dessas curvas. Esse fato também pode ser correlacionado diretamente com a inibição de crescimento das leveduras que não atingiram níveis mínimos de concentração. O Y50 estimado das curvas foi de 1,41 para esgoto bruto, 1,40 para efluente UASB, 1,39 para efluente lodos ativados e 1,38 para o filtro de areia.

Figura 68. Curva padrão do 17β-estradiol referente ao Ensaio 2.

Figura 69. Curvas dose-resposta das amostras de EB e EU relativas ao Ensaio 2.

Figura 70. Curvas dose-resposta das amostras de EL e EF relativas ao Ensaio 2.

Ensaio 3

Conforme demonstrado na figura 71, novamente o formato sigmoidal da curva padrão de 17β -estradiol está presente, o que atende o esperado. Os resultados da curva padrão obtidos foi 2,90 para máxima indução da β -galactosidade, 1,61 para o limite de detecção, 2,25 para o Y50 e $4,25 \mu\text{g. L}^{-1}$ para o EC50.

A curva dose-resposta de esgoto bruto e UASB (Figura 72) foi a que apresentou maior toxicidade para o crescimento da levedura (Tabela 42). Os valores registrados atingem 81%. O Y50 foi de 1,14 para a curva com efluente do reator UASB. Enquanto que a curva do esgoto bruto apresentou o desenho típico de inibição do crescimento.

Tabela 42 - Estimativa da toxicidade para amostras com inibição de crescimento da levedura no Ensaio 3.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Bruto	0,78	0,79	0,80	0,81	0,61	0,12				0,06	0,02	0,00
UASB	0,81	0,12		0,01				0,00	0,09	0,05	0,01	0,03
L.A.			0,01								0,01	
F.A.	0,06					0,01	0,06	0,02	0,02	0,00	0,05	

nota: L.A.: Lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

O valor estimado de Y50 para as amostras de lodos ativados e filtros de areia no ensaio 3 foi de 1,14 para os dois casos. Esse valor reflete a semelhança da curva e suas retas que foram traçadas (Figura 73).

Figura 71. Curva padrão do 17β-estradiol referente ao Ensaio 3.

Figura 72. Curvas dose-resposta das amostras de EB e EU relativas ao Ensaio 3.

Figura 73. Curvas dose-resposta das amostras de EL e EF relativas ao Ensaio 3.

Ensaio 4

O formato sigmoidal foi encontrado novamente na curva padrão de 17 β -estradiol (Figura 74). Sua máxima indução da β -galactosidade foi de 2,3 enquanto que seus limites de detecção resultaram em 1,38 e seu EC50 em 4,25 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

O Y50 estimado para as curvas dose-respostas das amostras foram de 1,10 para lodo ativado e filtro de areia. Enquanto que as curvas de esgoto bruto e efluente UASB apresentaram formato típico de curvas em que as leveduras sofreram inibição de crescimento (Figura 75 e Tabela 43). Os maiores valores encontrados foram nas amostras mais concentradas, ou seja, com menor diluição.

Tabela 43 - Estimativa da toxicidade para amostras com inibição de crescimento da levedura no Ensaio 4.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Bruto	0,76	0,77	0,80	0,80	0,76	0,10				0,02		0,02
UASB	0,78	0,80	0,52	0,08	0,05					0,02	0,02	0,02
L.A.	0,02	0,02										
F.A.	0,09	0,06	0,01				0,03	0,01	0,03	0,02	0,03	0,01

nota: L.A.: Lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Na Figura 76, a curva apresentou um formato muito parecido com a Figura 73. Observa-se que no final dessas curvas, onde as diluições são maiores, existe uma possível tendência de que a curva venha a subir caso as diluições continuassem.

Figura 74. Curva padrão do 17 β -estradiol referente ao Ensaio 4.

Figura 75. Curvas dose-resposta das amostras de EB e EU relativas ao Ensaio 4.

Figura 76. Curvas dose-resposta das amostras de EL e EF relativas ao Ensaio 4.

Ensaio 5

Assim como observado nos ensaios anteriores, os resultados mostram que houve problemas na resposta do teste YES. Novamente, observou-se que ocorreu inibição do crescimento da levedura nas amostras mais concentradas. Os valores de toxicidade estão apresentados na Tabela 44.

Tabela 44 - Estimativa da toxicidade para amostras com inibição de crescimento da levedura no Ensaio 5.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Bruto	0,84	0,84	0,84	0,84	0,64	0,16						
UASB	0,85	0,37	0,09	0,06	0,06			0,02	0,01	0,00	0,01	
L.A.	0,02	0,02										
F.A.	0,09	0,06	0,01		0,01		0,02	0,01	0,01	0,03	0,06	

nota: L.A.: Lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Assim como nos demais ensaios as curvas dose-respostas dos quatro tratamentos não foram satisfatórias por problemas de inibição no crescimento da levedura nas amostras mais concentradas. Isto é facilmente observado nas Figuras 78 e 79. Na Figura 78, observa-se a maior inibição do crescimento da levedura devido à toxicidade da amostra.

Figura 77. Curva padrão do 17β-estradiol referente ao Ensaio 5.

Na figura 77 estão ilustrados os resultados para a curva padrão de 17β -estradiol no formato sigmoidal, o que atende o esperado. Os resultados obtidos para essa curva foram: 2,70 para a máxima indução da β -galactosidade, 1,18 para o limite de detecção, 1,94 para o Y50 e $3,82 \mu\text{g. L}^{-1}$ para o EC50.

Figura 78. Curvas dose-resposta das amostras de EB e EU relativas ao Ensaio 5.

Figura 79. Curvas dose-resposta das amostras de EL e EF relativas ao Ensaio 5.

Ensaio 6

Conforme demonstrado na figura 80, novamente o formato sigmoidal da curva padrão de 17β -estradiol está presente, o que atende o esperado. Os resultados da curva padrão obtidos foram de 3,88 para máxima indução da β -galactosidade, 1,38 para o limite de detecção, 2,63 para o Y50 e $3,82 \mu\text{g. L}^{-1}$ para o EC50.

A Figura 81 pode ser considerada como um exemplo típico de inibição do crescimento das leveduras, onde as suas curvas decrescem à medida que a concentração aumenta. Como pode-se observar na Tabela 45, os quatro primeiros poços com maior concentração foram os que apresentaram uma toxicidade mais intensa.

Já nas curvas da Figura 82, as amostras de lodo ativados e filtro de areia apresentou um moderada toxicidade comparada com a da Figura 81.

Tabela 45 - Estimativa da toxicidade para amostras com inibição de crescimento da levedura no Ensaio 6.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Bruto	0,78	0,81	0,82	0,84	0,74	0,06					0,05	
UASB	0,79	0,82	0,86	0,89	0,76	0,26	0,04	0,00	0,01	0,06	0,03	
L.A.	0,05	0,01	0,05	0,05		0,02						0,07
F.A.	0,19				0,00	0,05	0,06	0,04	0,01	0,02	0,01	

nota: L.A.: Lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Figura 80. Curva padrão do 17 β -estradiol referente ao Ensaio 6.

Figura 81. Curvas dose-resposta das amostras de EB e EU relativas ao Ensaio 6.

Figura 82. Curvas dose-resposta das amostras de EL e EF relativas ao Ensaio 6.

Ensaio 7

No sétimo ensaio a curva padrão de 17β -estradiol resultou nos seguintes valores: 3,9 para a máxima indução da β -galactosidade, 1,29 para o limite de detecção, 2,6 para o Y50 e $7,22 \mu\text{g. L}^{-1}$ para o EC50. Esses foram os maiores valores encontrados para a curva padrão.

Visualizando a Tabela 46, percebe-se uma acentuada inibição das amostras de esgoto bruto e UASB, o que refletiu no formato da curva (Figura 84). Já a curva da Figura 85 apresentou um comportamento parecido com a Figura 67 do primeiro ensaio em que novamente houve uma tendência de crescimento nas diluições menores

Tabela 46. Estimativa da toxicidade para amostras com inibição de crescimento da levedura no Ensaio 7.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Bruto	0,73	0,76	0,78	0,78	0,29	0,00						
UASB	0,77	0,80	0,83	0,87	0,83	0,37	0,20	0,04		0,01		
L.A.	0,064											
F.A.	0,197						0,020	0,040	0,038	0,017		

nota: L.A.: Lodos ativados; F.A.: Filtro de areia.

Figura 83. Curva padrão do 17β-estradiol referente ao Ensaio 7.

Figura 84. Curvas dose-resposta das amostras de EB e EU relativas ao Ensaio 7.

Figura 85. Curvas dose-resposta das amostras de EL e EF relativas ao Ensaio 7.

Conforme observados em todas as análises de estrogenicidade do teste YES, as leveduras presentes em amostras de esgoto apresentaram toxicidade. Percebe-se que as amostras que mais sofreram inibição foram a de esgoto bruto e reator UASB, pois pode-se supor que as substâncias que interferem no teste estejam presentes em maior concentração nestas amostras.

Resumidamente, todas as curvas padrão apresentaram forma sigmoide, como era de se esperar. No entanto, as demais curvas de dose-resposta não se assemelharam ao formato e apresentaram um comportamento bastante distante quando comparado com a curva padrão.

No geral, alguns fatores podem ser apontados como possíveis causas destes resultados. Alguns autores descrevem que possivelmente as causas estão relacionadas ao número inicial de células de levedura, que influencia na sensibilidade do teste, sendo que quanto maior este número maior a sensibilidade do teste, ou seja, menor o valor de EC_{50} . Ainda, o tempo de incubação é apontado como um dos fatores interferentes no teste. Um menor tempo de incubação reduz a β -galactosidase, ou seja, obtém-se valores superiores de EC_{50} (BERESFORD et al., 2000; HAMBLE et al. e FRISHE et al., 2000),

Algumas suposições podem ser levantadas em relação aos problemas observados. Uma delas é a influência do processo de extração no teste YES. Alguns autores, como Citulski e Farahbakhsh (2012), expõem que o

procedimento de EFS pode influenciar nos resultados do teste, já que pode ocorrer a co-extração de compostos que causam toxicidade na extração por fase sólida das amostras. Entretanto, este problema é mais observado em amostras fortemente contaminadas ou com a presença de biossólidos, como é o caso de amostras de esgoto ou de lodo, e por isso algumas amostras requerem etapas adicionais de purificação além do clean up na extração em fase sólida (ALDA e BARCELÓ, 2001; CITULSKI e FARAHBAKHS, 2012).

Deste modo, os resultados obtidos deixam dúvidas quanto à presença de demais compostos no esgoto que pudessem interferir nos resultados. Para melhor esclarecer este problema são necessários novos estudos para entender os interferentes, principalmente em amostras com grande quantidade de biossólidos.

6. CONCLUSÕES

A combinação dos processos biológicos sequenciais apresentou satisfatória robustez em termos de remoção de matéria orgânica, microrganismos indicadores e (oo)cistos.

A melhor eficiência de remoção de coliformes totais e *E. coli* nos ensaios físicos químicos de Jar Test foi obtida com cloreto férrico quando comparado com sulfato de alumínio. A remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. não foi significativa em relação aos tratamentos realizados com os coagulantes cloreto férrico e sulfato de alumínio. A remoção de fósforo no tratamento físico-químico com cloreto férrico foi significativa nos efluentes do reator UASB e sistema de lodos ativados, demonstrando ser uma opção devido tanto a eficiência de remoção quanto aos benefícios ambientais que traz em relação à toxicidade do sulfato de alumínio.

Os (oo)cistos de protozoários foram removidos no sistema de tratamento combinado em nível de não detecção do procedimento utilizado, podendo-se considerar ausência desses organismos no efluente final do sistema de filtração.

A desinfecção com cloro mostrou-se eficiente em inativar os microrganismos indicadores, fornecendo efluente com menor risco à saúde pública, considerando que as formas mais resistentes, por exemplo, os (oo)cistos de protozoários, ficaram retidos no filtro de areia.

A atividade estrogênica, avaliada pelo teste YES, foi maior no efluente do lodo ativado e do filtro de areia devido à conjugação dos compostos estrogênicos no esgoto bruto. Isso demonstra que a ETE removeu a estrogenicidade do efluente durante as etapas de tratamento.

Detectou-se toxicidade à levedura utilizada no teste YES (*Saccharomyces cerevisiae*), principalmente nas menores diluições, a qual interferiu na expressão da estrogenicidade impossibilitando o cálculo em termos de concentração equivalente de 17 β -estradiol.

5. SUGESTÕES

Parasitologia – Análise de Giardia ssp. e Cryptosporidium spp.

- ✓ Ampliar e aprimorar a metodologia de pesquisa referente a (oo)cistos protozoários presentes em estações de tratamento de esgoto.
- ✓ Estudar a relação entre turbidez das amostras e taxa de recuperação em ensaios com protozoários.
- ✓ Quantificar protozoários existentes em lodos de estação de tratamento de esgoto.

Estrogenicidade – Teste YES

- ✓ Identificar compostos responsáveis pela atividade estrogênica em amostras de esgoto.
- ✓ Estudar a conjugação de compostos estrogênicos em amostras de esgoto.
- ✓ Pesquisar a relação entre a inibição do crescimento de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e a conjugação de compostos estrogênicos em amostras de esgoto.
- ✓ Analisar se aumentando o fator de diluição das amostras a curva resposta tenderia ao formato sigmoidal esperado.
- ✓ Realizar estudos para definir técnicas de extração em fase sólida mais adequadas para amostras de esgoto.
- ✓ O repique da levedura deve ser realizado diretamente da cepa matriz para que a linhagem genética não se modifique e prejudique os resultados do teste YES.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, R. D. **Biology of *Giardia lamblia***. Clinical microbial. Reviews 14: p. 447-475. 2001.

AHERNE, G. W.; ENGLISH, J.; MARKS, V. **The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 9, p. 79-83, 1985.

AIYUK, S. et al. **Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates: A review**. *Bioresource Technology*. v. 97, n. 17, p. 2225-2241, 2006.

ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. **Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid- phase extraction-liquid chromatography-diode array detection**. Journal of Chromatography A, v. 911, n. 2, p. 203-210, 2001.

ALEXANDER, B. et al. **A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC₅₀**. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 41, n. 2-3, p. 55-58, 1999.

ALMEIDA, O. A.. **Qualidade da água de irrigação**. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.

AMERICAN CHEMISTRY COUNCIL (ACC). **Chemicals in the environment and the endocrine system**. Disponível em: <http://www.americanchemistry.com/s_phthalate/sec.asp?CID=2014&DID=8697>. Acesso em: 19 jan. 2013.

ANA. Agência Nacional de Águas. **Atlas regiões metropolitanas: abastecimento urbano de água: resumo executivo**. Brasília. 120 p. 2009.

ANDRADE, C. L. T. **Circular Técnica: seleção do sistema de Irrigação**. EMBRAPA. Sete lagoas, MG. 2001.

ANKARKLEV, J.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVÄRD, S. G. **Behind the smile: cell biology and diEse mechanisms of *Giardia* species.** Nature reviews microbiology. v. 8. 2010.

ATHERHOLT, T. B.; LECHEVALIER, M. W.; NORTON, W. D.; ROSE, J. S.. **Effect of rainfall on *Giardia* and *Crypto*.** Journal of American Water Works Association 90(9), p. 66-80, 1998.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura.** Tradução de R. S. Gheyi et al. Campina Grande: UFPB, 218 p. 1999.

AZEVEDO, L. P.; OLIVEIRA, E. L. **Efeitos da aplicação de efluentes de tratamento de esgoto na fertilidade do solo e produtividade de pepino sob irrigação subsuperficial.** Engenharia Agrícola, Jaboticabal. v. 25, n.1, p.253-263, 2005.

BAREL-COHEN, K.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M.; WENZEL, A.; MUELLER, J.; KRONFELD-SCHOR, N. **Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river.** Journal of Environmental Management, v. 78, n. 1, p. 16-23, 2006.

BARONTI, C., CURINI, R., D'ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A., SAMPERI, R. **Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and its receiving river water.** Environmental Science Technology, 34, p. 5059–5066, 2000.

BARROS, C. PAULINO, W. R. **Os Seres Vivos: reino dos protistas.** 2005.

BARTONE, C. R.; ARLOSOROFF, S. **Reuse of pond effluent in developing countries.** Watersci. Technol. 19(12), p. 289-297, 1987.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; KELLER, R. **Organismos Patogênicos e Efeitos sobre a Saúde Humana.** In: Desinfecção de Efluentes Sanitários. PROSAB 3. Ricardo Franci Gonçalves (coord.), p. 27-88. 2003.

BELFROID, A. C., VAN DER HORST, A., VETHAAK, A. D., SCHAFER, A. J., RIJS, G. B. J., WEGENER, J., COFINO, W. P. **Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands.** Science of the Total Environment 225, p. 101-108. 1999.

BELLAMY, W.D.; HENDRICKS, D.W.; LOGSDON, G.S. **Slow sand filtration: influences of selected process variables.** Journal American Water Works Association, v.77 n.12, p.62-66, Dez. 1985.

BERESFORD, N. et al. **Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 162, n. 1, p. 22-33, 2000.

BILA, D. M. **Degradação remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17- estradiol pelo processo de ozonização.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências.** v. 33. Química Nova, p. 651–666, 2007.

BIRKETT, J. W. **Scope of the problem.** In: BIRKETT, J. W.; LESTER, J.N. (Eds.). Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process. Boca Raton: CRC p. 9-43, 2003.

BISTAN, M. et al. **Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies.** Food Technology and Biotechnology, v. 50, n. 4, p. 427-433, 2012.

BISWAS, A. K. **Role of wastewater reuse in water planning and management.** Treatment and Reuse of Wastewater, Ed. Butterworths, 1988.

BONATTI, T. R. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos da família Ascarididae em amostras de lodo de esgoto.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 157 p. 2007.

BOULTER-BITZER, J. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T.. **Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*.** *Biotechnology Advances*. v. 25, n. 1, p.13-44, 2007.

BOURI. S.; ABIDA. H.; KHANfir. H.. **Impacts of wastewater irrigation in arid and semi arid regions: case of Sidi Abid region, Tunisia.** Environmental Geology Journal, New York, v. 53, p. 1421–1432, 2007.

BRAATZ, S.; KANDIAH, A. **Utilización de aguas residuales urbanas para el riego de árboles y bosques Unasylva.** Revista Internacional de silvicultura e industrias forestales. Roma, Italy. v. 47 n. 185, p. 45-52, 1996.

BRAGA, O., SMYTHE, G.A., SCHAFER, A.I., FEITZ, A.J. **Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants.** *Environmental Science & Technology* 39, p. 3351-3358. 2005.

BRANDT, E. M. F. **Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (reatores UASB seguidos de pós-tratamento).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 128 p. 2012.

BUKHARI, Z.; SMITH, H. V.; SYKES, N. HUMPHREYS, S. W.; PATON, C. A. GIRDWOOD; FRICKER, C. R. **Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England.** *Wat. Sci. Tech.* 35 (11-12): p. 385-390, 1997.

CACCIO, S. M. **Epidemiology of *Cryptosporidium*.** Food Pathogen Epidemiology. Microbes, Maladies and Methods. The National Food Centre, Research e Training for the food Industry. European Union Risk Analysis Information Network (EU-RAIN) Two Day International Conference. Padua. Italy. 2 nd-3 rd December, 2004.

CALIMAN, F. A.; GAVRILESCU, M. **Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review.** *Clean*, 37, p. 277 – 303. 2009.

CAMPOS, J. R. (Coord.). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbico e disposição controlada no solo.** Rio de Janeiro: PROSAB, 1999.

CANDELA, L.; FABREGAT, S.; JOSA, A.; SURIOL, J.; VIGUÉS, M. A. S. J. **Assessment of soil and groundwater impacts by treated urban wastewater reuse.** A case study: Application in a golf course (Girona, Spain). *Science of The Total Environment*, St. Louis. v. 374, p. 26-35, 2007.

CANTUSIO, R. N. **Estudo dos métodos:** Flocculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas. Tese de Doutorado. Unicamp, Campinas. 2008.

CANTUSIO-NETO, R. et al. ***Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in samples of natural water from the Atibaia River, city of Campinas, São Paulo, Brazil.** *Water Science Technology*, v.62, n. 1, p. 217-222, 2010.

CANTUSIO-NETO, R. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes ponto do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 89p. 2004.

CANTUSIO-NETO, R.; SANTOS, L. U.; FRANCO, R. M. **Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil.** *Water Science and Technology*, v. 54, n. 3, p. 89-94, 2006.

CAPRA, A.; SCICOLONE, B. **Water quality and distribution uniformity in drip / trickle irrigation systems.** *Journal of Agricultural Engineering Research*, v. 70, n. 4, p. 355-365, 1998.

CAREY CM, LEE H, TREVORS JT. **Biology, persistence** and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Wat Res* 38: 818-862, 2004.

CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. **Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water.** *Wat. Sci. Tech.* 47 (7): p. 31-37, 2000.

CASES, V., ALONSO, V., ARGANDOÑA, V., RODRIGUEZ, M., PRATS, D. **Endocrine dis-rupting compounds: a comparison of removal between conventional activated sludge and membrane bioreactors.** *Desalination* 272, p. 240-245. 2011.

CIMERMAN B; FERRAZ ,C. A. M., PAOLI, L.A., TAMBURUS, W. **Tratamento da giardíase em crianças com tinidazol.** *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica* 6: p. 451-452, 1977.

CITULSKI, J.; FARAHBAKHS, K. **Overcoming the toxicity effects of municipal wastewater sludge and biosolid extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) assay.** *Chemosphere*, v. 87, n. 5, p. 498-503, 2012.

CLAPAUCH, R., MEIRELLES, R. M. R., JULIÃO, M. A. S. G., LOUREIRO, C. K. C., GIARO-DOLI, P. B., PINHEIRO, S. A. et al. **Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da SBEM.** *Arq Bras Endocrinol Metab.* 46(6): p. 679-95. 2002.

CLARA, M., STRENN, B., SARACEVIC E. e KREUZINGER, N.. **Adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol to sewage sludge.** Chemosphere 56, p. 843-851, 2004.

COUTINHO, J. O. **Contribuição para o estudo da *Giardia lamblia* Stiles, 915.** Arquivos de Higiene e Saúde Pública 25: p. 273-280, 1960.

CRANFIELD UNIVERSITY. **Urban Water Recycling Information Pack.** UK. 2001.

CZATKA, C. P; LONDREY, K.L. **Anaerobic biotransformation de estrogens.** Science of the Total Environment, v. 367, p. 932-941, 2006.

DAMGAARD, I. N., MAIN, K. M., TOPPARI, J. e SKAKKEBAEK, N. E. **Impact of exposure to endocrine disruptors in utero and childhood on adult reproduction.** Best Practice & Research Clinical endocrinology & metabolism. Cl. En. 16, p. 289-309, 2002.

DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; VAN DER KRAAK, G. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors Chapter 1.** [database on the internet] on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organization and the United Nations Environment Programme. International Programme on Chemical Safety. Geneva. Switzerland. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/publications//ch1.pdf>> Acesso em: 29 set. 2013.

D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M; SAMPERI, R. **Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities.** Science of the Total Environment, v. 302, p. 199– 209, 2003.

DE BOEVER, P. et al. **Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder.** Environmental Health Perspectives, v. 109, n. 7, p. 691-697, 2001.

DE LEAN, A.; MUNSON, P. J.; RODBARD, D. **Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves:** application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism and Gastrointestinal Physiology, v. 4, n. 2, p. E97-E102, 1978.

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C. et al. **Identification of**

Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science Technology*. v. 32 (11), p. 1549- 1558, 1998.

DIAMANTI-KANDARAKIS et al. **Endocrine-Disrupting Chemicals:** An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* 30(4), p. 293-342, 2009.

DIAS Jr., O. **Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras/SP.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 1999.

DOBELL, C. **Antony van Leeuwenhoek and his “little animals.”** John Bale Sons and Danielsson, London, United Kingdom. (Also in a 1960 paperback unabridged edition published by Dover Publications, New York, N.Y.). 1932.

EDSP/USEPA, 2012. **Endocrine Disruptor Screening Program.** U.S. Environmental Protection Agency. Universe of Chemicals. Nov/2012. Disponível em:

<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edsp_chemical_universe_list_11_12.pdf> Acesso em: 17 jan. 2014.

EFSA Scientific Committee. **Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors:** scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA Journal* 2013, 11(3):3132. [84 pp.] doi: 10.2903/j.efsa.2013.3132. Disponível em: < www.efsa.europa.eu/efsajournal>. Acesso em: 02 abr. 2014.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). **Guidelines for Water Reuse.** 2004.

FAO. **User manual fro irrigation with treated wastewater.** FAO Regional Office for the Near East. Cairo. 2003.

FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. **Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil.** *Brazilian Journal Microbiology*. v. 33, n. 1, p. 41-43, 2002.

FASCIOLO, G. E.; MECA, M.I .; GABRIEL, E.; MORÁBITO, J. **Effects on crops of irrigation with treated municipal wastewaters.** *Water Science and Technology*, Oxford. v. 45, n. 1, p. 133-8, 2002.

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. **Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection.** Berlin: Springer-Verlag, 224 p,1991.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Review*. vol. 24 (1), p. 110 - 140. 2011.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 B-estradiol e de 17 α -Ethinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂.** 2008. 173p. Tese (doutorado em Ciências em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, COOPE, Rio de Janeiro, 2008.

FLORENCIO, L.; BASTOS, R. K. X. B.; AISSE, M. M.. **Tratamento e utilização de esgotos sanitários.** Projeto PROSAB. Rio de Janeiro: ABES, 2006.

FONSECA, A. F. **Disponibilidade de nitrogênio, alterações nas características químicas do solo e do milho pela aplicação de efluente de esgoto tratado.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 110 p. 2001.

FONTENELE, E. G. P; MARTINS M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; JÚNIOR, R. M. M. **Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos.** *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 54/1. 2010.

FRANCO, R. M. B. **Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública.** *Revista Panamericana de Infectologia*. 9(4): p. 36-43. 2007.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. **Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 43, n. 2, p. 109-111, 2001.

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

GAJADHAR, A. A.; FORBES, L. B. **An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food**

safety, with example data on trichinellosis. *Veterinary Parasitology*, vol. 103, p.133 –140, 2002.

GARDNER-OUTLAW, T. e ROBERT, E.. **Sustaining Water, Easing Scarcity: A Second Update: Revised Data for the Population Action International Report: Sustaining Water: Population and the Future of Renewable Water Supplies.** Washington, D.C.: Population Action International. 1997

GHISELLI, G.; JARDIM, W. **Interferentes endócrinos no ambiente.** *Química Nova* 30(3): p. 695-706, 2007.

GUIMARÃES, J. P. R. F. (2005). **Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional.** Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional (ACPO). Disponível em: <http://www.acpo.org.br/disruptores_endocrinos.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2012.

GUIMARÃES, T. S.; DUARTE, R. G. **Deteccção e quantificação dos Hormônios Sexuais 17 β -estradiol (e2), estriol (e3), estrona (e1) e 17 α -etinilestradiol (ee2) em Água de Abastecimento:** Estudo de Caso da Cidade de São Carlos, com Vistas ao Saneamento Ambiental. 24° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1-8, 2007.

HACHICH, E.M. et al. ***Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of Sao Paulo State, Brazil.** *Water Science Technology*, v. 50, n. 1, p. 239- 245, 2004.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; LUTZHEFT, H. C. H.; JØRGENSEN, S. E. **Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment – A review.** *Chemosphere*, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.

HASHIMOTO, T., ONDA, K., NAKAMURA, Y., TADA, K., MIYA, A., MURAKAMI, T. **Comparison of natural estrogen removal efficiency in the conventional activated sludge process and the oxidation ditch process.** *Water Research*, 41, p. 2117–2126, 2007.

HASHIMOTO, T.; MURAKAMI, T. **Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments.** *Water Research*, 43, p. 573–582, 2009.

HEINDEL, J. J. **Endocrine disruptors and the obesity epidemic.** *Toxicologic*

Science. p. 247-24, 2003.

HELLER, L.; BASTOS, R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M.; BEVILACQUA, P. D.; BRITO, L. L. A.; MOTA, S. M. M. **Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia***: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. Epidemiologia e Serviços de Saúde 13(2), p. 79-92, 2004

HESPANHOL, I. **Potencial de reúso de água no Brasil**: agri-cultura, indústria, município e recarga de aquíferos. In: MAN- CUSO, C. S. A; SANTOS, H. F. (Editores). Reúso de água. Barueri, SP: Manole, p. 37-95, 2003.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. **Drugs and drug metabolites as environmental contaminants**: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. Life Sciences, v. 20, n. 2, p. 337-341, 1977.

HSU BM, YEH HH. **Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water treatment: a pilot-scale study**. Wat Res 37: 1111-1117, 2003.

HUSSAIN I.; L. RASCHID, M. A.; HANJRA, F.; MARIKAR, W.; VAN DER HOEK. **Wastewater use in agriculture**: Review of impacts and methodological issues in valuing impacts (With an extended list of bibliographical references). Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute, Working Paper 37, 2002.

JANOSECK, J.; HILSCHEROVÁ, K.; BLÁHA, L.; HOLOUBEK, I. **Environmental xenobiotics and nuclear receptors-Interactions, effects and in vitro assessment**. Toxicology in Vitro, v. 20, p. 18–37, 2006.

JENSEN, T. K., ANDERSON, A. N. e SKAKKEBAEK, N. E. **Is human fertility declining?** Proceedings of the 18th World Congress on Fertility and Sterility, International Federation of Fertility Society (IFFS). Montreal, p. 32-44, 2004.

JOHNSON, A. C. e SUMPTER, J. P.. **Removal of endocrine disrupting chemicals in activated sludge treatment works**. Environmental Science Technology 35, p. 4697-4703, 2001.

JOHNSON, A. C., BELFROID, A., DI CORCIA, A. **Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent**. Science of the Total Environment 256, p. 163-173. 2000.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. **Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent.** Science of The Total Environment, v. 256, p. 163-173, 2000.

JOSS, A., ANDERSEN, H., TERNES, T., RICHLE, P.R., SIEGRIST, H. **Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization.** Environmental Science & Technology 38, p. 3047e3055. 2004.

JUNIOR, R. M. M; FERNANDEZ, V. O. **A obesidade e os disruptores endócrinos.** Revista ABESO. Ed. 42. Ano VIX. 2009.

KALAVROUZOTIS, I. K.; APOSTOLOPOULOS, C. A.. **An integrated plan for the reuse of treated wastewater effluents from WWTP in urban áreas.** Building and Environment. vol. 42. P. 1862–1868, 2007.

KARANIS, P. KOURENTI, C.; SMITH, H.. **Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt.** Journal of Water and Health. vol.5 , n.1, p 1-38, 2007.

KEAN, B. H., MOTT, K. E. e RUSSELL, A. J. (Ed.). **Tropical medicine and parasitology: classic investigations.** Cornell University Press, Ithaca, N.Y. 1978.

KELLER, R., PASSAMANI-FRANCE, R. F., PASSAMANI, F., VAZ, L., CASSINI, S. T., SHERRER, N., RUBIM, K., SANT'-ANA, T. D., & GONCALVES, R. F. **Pathogen removal efficiency form UASB+BF effluent using conventional and UV post-treatment systems.** Water Science Technology, 50, p. 1–6 . 2004.

KIM, S.; AGA, D. S. **Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants.** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, v. 10, n. 8, p. 559-573. 2007.

KISTEMANN, T. et al. **A comparison of efficiencies of microbiological pollution removal in six sewage treatment plants with different treatment systems.** International Journal of Hygiene and Environmental Health. vol. 211, p. 534-545. 2008.

KORNER, W., SPENGLER, P., BOLZ, U., SCHULLER, W., HANF, V., METZGER, J. W.. **Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany 2. Biological analysis.** Environmental Toxicology Chemical 20, p. 2142–2151, 2001.

KORTENKAMP, A; MARTIN, O; FAUST, M; EVANS, R; MCKINLAY, R; ORTON, F; ROSIVATZ, E. **State of the art assessment of endocrine disrupters.** Final Report Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3, 2011.

KRAMER, A; POST, J. **Guidelines and Standards for Wastewater Reuse.** Compiled by: Adelphi Reseach Berlin. Disponível em: <http://cgi.tu-harburg.de/~awwwweb/wbt/emwater/documents/lesson_d1.pdf>. Acesso em: 14 set. 2013.

LAVRADOR FILHO, J. **Contribuição para o entendimento do reuso planejado da água e algumas considerações sobre suas possibilidades no Brasil.** Dissertação de mestrado. Escola Politécnica da USP, São Paulo, 1987.

LEAL, D. A. G. et al. **First Report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in Oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and Cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil.** *Journal Water Health*, v. 6, n. 4, p. 527-532, 2008.

LECHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.. ***Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water.** *Journal American Water Works Association* 87(9), p. 54-68, 1995.

LEE, H. B., e LIU, D. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water, Air, and Soil Pollution*, p. 134-353. 2002.

LEE, H. B., PEART, T. E., CHAN, J. AND GRIS, G. **Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in sewage and sludge samples in Toronto, Canada.** *Water quality research journal of Canada*, 39, p. 57-63, 2004.

LEE, J.; LEE, C. B.; RA, J. S.; CHO, J.; KIM, I. S.; CHANG, N. I.; KIM, H. K.; KIM, S. D. **Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes.** *Chemosphere* 71, p. 1582–1592, 2008.

LEE, L. S.; STROCK, T. J.; SARMAH, A. K.; SURESH, P.; RAO, C. **Sorption**

and dissipations of testosterone, estrogens and their primary transformation products in soil and sediment. *Environmental Science and Technology*, v. 37, n. 18, p. 4098- 4105, 2003.

LEWIS, R. W., BILLINGTON, R., DEBRUYNE, E., GAMER, A., LANG, B., CARPANINI, F. **Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies.** *Toxicol. Pathol.* 30 (1), p. 66–74. 2002.

LI, D. et al. **Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light.** *Water Research*. v. 43, n. 12, p. 3037-3046, 2009.

LINTELMANN, J; KATAYANA, A; KURIHARA, N; SHORE, L; WENZEL, A. **Endocrine Disruptors in the Environment.** *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.

LISHMAN, L., SMYTH, S.A., SARAFIN, K., KLEYWEGT, S., TOITO, J., PEART, T., LEE, B., SERVOS, M., BELAND, M., SETO, P. **Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada.** *Science of the Total Environment* 367, p. 544-558. 2006.

LOEHR, R. C.; OVERCASH, M. R. **Land treatment of wastes: concepts and general design.** *Journal of Environmental Engineering, ASCE*, 111 (2), p. 141-160, 1985.

MACPHERSON, C. N. L. **Human behavior and epidemiology of parasitic zoonoses.** *International Journal Parasitology*, v. 35, p. 1319-1331, 2005.

MANCUSO, P. C. S. **O reuso da água e sua possibilidade na Região Metropolitana de São Paulo.** Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 1992.

MARKEY, C. M.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. **Endocrine disruptors:** from Wingspread to environmental development biology. *The journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 83: p. 235-244. 2003.

MARTIN, O. V.; LESTER, J.N.; VOULVOULIS, N.; BOOBIS, A. R. **Forum:** Human Health and Endocrine Disruption: A Simple Multicriteria Framework for the Qualitative Assessment of End Point–Specific Risks in a Context of Scientific Uncertainty. *Toxicological Sciences* 98(2), p. 332–347, 2007.

McCUIN, R. M., CLANCY, J. L. **Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewater.** Journal of Microbiological Methods. V. 63, p.73-78. 2005.

MEDEIROS, R. C. **Avaliação da remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em processos de tratamento de esgoto sanitário.** 300P. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos. 2013.

MELI, S.; PORTO, M.; BELLIGNO, A.; BUFO, S. A.; MAZZATURA, A.; SCOPA, A. **influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbiological soil parameters in a citrus orchard under Mediterranean condition.** Science of the Total Environment , Michigan. v. 285, p. 69-77, 2002.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse.** McGraw-Hill Science/Engineering/Math; 4th edition. 2848 p. 2007.

MONTEMAYOR, M. et al. **Occurrence of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain.** *Journal Applied Microbiology*, v. 99, p. 1455-1462, 2005.

MORAES, D. S. L. e JORDÃO, B. Q. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana.** *Revista Saúde Pública*, São Paulo, n.36, 2002.

MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção.** Projeto PROSAB. Rio de Janeiro: ABES, 2009.

MOTA, S.; BEZERRA, F. C.; TOMÉ, L. M. **Avaliação do desempenho de culturas irrigadas com esgoto tratado.** 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1999.

NAKADA, N., TANISHIMA, T., SHINOHARA, H., KIRI, K., TAKADA, H. **Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment.** Water Research 40, p. 3297e3303. 2006.

NASSER, A. M. et al. **Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants - review article.** Journal of Applied Microbiology. vol. 113; p. 477- 484. 2012.

NELSON, E. D., DO, H., LEWIS, R. S., CARR, S. A. **Diurnal variability of pharmaceutical, personal care product, estrogen and alkylphenol concentrations in effluent from a tertiary wastewater treatment facility.** *Environmental Science & Technology* 45, p. 1228-1234. 2011.

NEWBOLD, R. **Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens.** *Environmental Health Perspectives*. 103(Suppl 7): p. 83-87, 1995.

NOAH, M. **Explaining the active sludge process.** National Small Flows Clearing house – West virginia University, Vol. 14. N2, 2003.

OLIVEIRA, G. L. **Processo de tratamento biológico e físico-químico combinados visando o reúso de esgoto sanitário. 177p..** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Carlos. 2012

OLIVEIRA, S. M. A; VON SPERLING, M. **Avaliação de 166 ETEs em operação no país, compreendendo diversas tecnologias.** Parte I análise de desempenho. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. Vol.10, n. 4, p.347-357. 2005.

OMS-World Health Statistics, 2008. Disponível em: <<http://www.oms.com>>. Acesso em: 18 set. 2010.

OTTOSON, J. et al. **Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant.** *Water Research*. v. 40, p.1449-1457, 2006.

PAYMENT P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. **Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility.** *Can. J. Microbiol.* 47: p. 188-193, 2001.

PESCOD, M. D. **Wastewater treatment and use in agriculture.** Rome: FAO, 125 p. 1992.

PIMENTEL, D. e PIMENTEL, M. **Sustainability of Meat- based and Plant-based Diets and the Environment.** *American Journal of Clinical Nutrition* 78(3), p. 660S-663S, 2003.

PITTS, D.; PETERSON, K.; GILBERT, G. e FASTENAU, R. **Field assessment of irrigation system performance**. Transactions of the ASAE, 12, p. 307-313, 1996.

PIZARRO-CABELLO, F. **Riegos localizados de alta frecuencia**. Madrid, Mundi-Prensa. 471 p. 1990.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. ***Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions**. International Journal of Hygiene and Environmental Health. vol. 213, p. 321-333. 2010.

PURDOM, C. E., HARDIMAN, P. A., BYE, V. J., ENO, N. C., TYLER, C. R. e SUMPTER, J. P. **Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works**. Chemical Ecologic. V. 4, p. 275-285, 1994.

RAZZOLINI, M. T. P. et al. **Risk of *Giardia* infection for drinking water and bathing in a peri-urban area in São Paulo, Brazil**. International Journal of Environmental Health Research. vol. 21 (3), p. 222-234. 2011.

RASCHID-SALLY, L.; HOEK, W. N. D.; RANAWAKA, M. **Wastewater reuse in agriculture in Vietnam: Water management, environment and human health aspects**. Colombo, Sri Lanka. 48 p., 2001.

REN, Y-Y; NAKANO, K; NOMURA, M; CHIBA, N; NISHIMURA, O. **A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process**. Water Research, v. 41, p. 2341-2348, 2007.

RENDTROFF, R. C. **The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites**. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. American Journal of Hygiene 59: p. 209-220, 1954.

RIBEIRO, A. R.; CARVALHO, M. F.; AFONSO, C. M. M; TIRITAN, M. E.; CASTRO, P. M. L. **Microbial degradation of 17-estradiol and 17-ethynylestradiol followed by a validated HPLC-DAD method**. Journal of Environmental Science and Health – Part B – Pesticides, food contaminants and agricultural wastes. v. 5, n. 4, p. 265-273, 2010.

RICHARDSON, M. L. e BOWRON, J. M. **The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment**. Journal of Pharmacy and Pharmacology. p. 37,1-12, 1985.

ROCKWELL, R. L. ***Giardia lamblia* e giardiasis with particular attention to**

the Sierra Nevada, 2003. Disponível em <<http://www.yosemit.org/naturenotes/archive.htm>>. Acesso em: 14 jan. 2007.

ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A.. **Risk and control of waterborne cryptosporidiosis**. *FEMS Microbiology Review*. v. 26, p. 113-123, 2002.

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. **Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

SANTOS, L.U. et al. **Detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge by ether clarification technique and sucrose flotation**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, v. 46, p. 309-313, 2004.

SANTOS, L. U. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma estação de tratamento de esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 132 p. 2007.

SAUCEDO, D.; SAMMIS, T. W.; PICCHIONI; MEXAL, J. G.. **Wastewater application and water use of *Larrea Tridentata***. *Agricultural Water Management*, Amsterdam, p. 1-11, 2005.

SCALOPPI, E. J. **Características dos principais sistemas de irrigação**. ITEM – Irrigação e Tecnologia Moderna, n. 25, p. 22-27, 1986.

SCOTT, C. A.; ZARAZÚA, J. A. e LEVINE, G.. **Urban-wastewater reuse for crop Production in the water-short Guanajuato river basin, Mexico**. IWM Research Report Colombo, Sri Lanka, 35 p.2000.

SERVOS, M. R., BENNIE, D. T., BURNISON, B. K., JURKOVIC, A., MCINNIS, R., NEHELI, T., SCHNELL, A., SETO, P., SMYTH, S. A., TERNES, T. A. **Distribution of estrogens, 17 b-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants**. *Science Total Environmental*, 336 (1–3), p. 155–160, 2005.

SHARPE, R. M., **Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals**. *Toxicology Letters* 120, p. 221-232, 2001.

SHAW, I.; McCULLY, S. **A review of the potential impact of dietary endocrine disrupters on the consumer.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 471-476, 2002.

SILVA, A. L. **Interferentes endócrinos no meio ambiente:** um estudo de caso em amostras de água in natura e efluente de estação de tratamento de esgotos da Região Metropolitana de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

SISTEMA ENDRÓCRINO (GLANDULAR). Disponível em: <<http://sistemaendocrino.zip.net>>. Acesso em: 25 mai. 2014.

SLAPETA, J. **Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow.** *International journal for Parasitology*, Oxford, v. 43, n. 12-13, p. 957-970, 2013

SNEL, S. J. M. G.; BAKER, V.; KAMALESH, N. F.; LEARMONTH, J. **A tale of two parasites:** the comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. *Epidemiology and Infections*, v.137 p. 1641-1650, 2009.

SNYDER, S. A. P.; WESTERHOFF, Y. Y.; SEDLAK, D. L. **Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupters in Water:** Implications for Water Treatment, *Environ. Eng. Sci.*, 20, 449. 2003.

SODRÉ, F. F; LOCATELLI, M. A. F; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. **Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais.** *Caderno Temático*, Campinas, v. 6, p. 27, 2007.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica.** 7 ed. Rio de Janeiro: LCT, v. 2, p. 474, 2000.

SOUZA, J. A. R.. **Desempenho de microaspersores operando com água residuária de avicultura e bovinocultura.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 79 p. 2005.

STANLEY, L. E., MEYER, E. A. ***Giardia* and giardiasis:** biology, pathogenesis and epidemiology. Plenum Press, New York, 1984.

STAVRAKAKIS, C.; HEQUET, V.; FAUR, C.; ANDRES, Y.; LE CLOIREC, P.; COLIN, R. **Biodegradation Of Endocrine Disrupters: Case Of 17-Estradiol and Bisphenol A.** Environmental Technology 29, p. 269-27, 2008.

STUMPE, B.; MARSCHNER, B. **Long-term sewage application and wastewater irrigation on the mineralization and sorption of 17 β -estradiol and testosterone in soils.** Science of the Total Environment, v. 374, p. 282-291, 2007.

SVENSON, A.; ALLARD, A.; EK, M. **Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants.** Water Research, v. 37, n. 18, p. 4433-4443, 2003.

TAYLOR, G. L.; NEAL, L. A. **Land Treatment of Waste as an Industrial Siting Advantage.** Proceedings of the 37th Industrial Waste Conference, Purdue Univ., p. 233-238, 1982.

TERNES, T. A., ANDERSEN, H. R., GILBERG, D. e BONERZ, M.. **Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS.** Analytical Chemistry 74, p. 3498-3504, 2002.

THOMAS, D. B. **Do hormones cause breast cancer?** Cancer; v. 53, p. 595-604, 1984.

THOMPSON, R. C.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A. H. **Giardia and giardiasis.** Advance Parasitology 32: p. 71-160, 1993.

THORPE, K. L., CUMMINGS, R. I., HUTCHINSON, T. H., SCHOLZE, M., BRIGHTY, G., SUMPTER, J. P. e TYLER, C. R.. **Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish.** Environmental Science Technology 37, p. 1142-1149, 2003.

TOZE, S. **Reuse of effluent water-benefits and risk.** Agricultural Water Management. Amsterdam, v. 80, p. 147-159, 2005.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. **A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis.** Trends in Parasitology. vol. 24 (4), p. 184 - 189. 2008.

VEGAS, D. F. Remoção dos perturbadores endócrinos 17 β -estradiol e p-nonilfenol por diferentes tipos de carvão ativado em pó (CAP) produzidos no

Brasil - Avaliação em escala de bancada. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

VIENO, N; TUHKANEM, T; KRONBERG, L. **Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland.** Water Research, v.41, p. 1001-1012, 2007.

VILLARROEL, L. M. F. **Protozoários intestinais em material arqueológico..** Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 103p. 2013.

VILLENEUVE, D. L.; BLANKENSHIP, A. L.; GIESY, J. P. **Derivation and application of relative potency estimates based on in vitro bioassay results.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 19, n. 11, p. 2835-2843, 2000.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R. S.; JEGATHEESAN, V. (Eds.). **Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater.** Londres: IWA Publishing, 483 p. 2010.

VON SPERLING, M. **Principio do tratamento biológico de águas residuárias: introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 452p, 2005.

WANG, R.; ZHANG, X.; ZHU, H.; ZHANG, L.; FENG, Y.; JIAN, F.; NING, C.; QI, M.; ZHOU, Y.; FU, K.; WANG, Y.; SUN, Y.; WANG, Q.; XIAO, L. **Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in humans Henan, China, Experimental Parasitology**, vol.127, p. 42-45, 2011.

WHO/IPCS, 2002. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.** Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/>. Acesso em: 21 jan. 2014.

WHO/IPCS, 2002. **International Program on Chemical Safety. Global Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals.** Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines for safe wastewater use-more than just numbers. **Irrigation and Drainage**. Geneva, v. 54, p. 103-111, 2005.

XIAO, X. Y., MCCALLEY, D. V., MCEVOY, J. **Analysis of Estrogens in River Water and Effluents Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography – Negative Chemical Ionisation Mass Spectrometry of the Pentafluorobenzoyl Derivatives**. *Journal of Chromatography A*, v. 923, p. 195-204, 2001.

ZORITAA, S.; MARTENSSONB, L.; MATHIASSENA, L.. **Occurrence and Removal of Pharmaceuticals in a Municipal Sewage Treatment System in the South of Sweden**. *Science of the Total Environment* 407, p. 2760-2770, 2009.