

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

TALLYSON TAVARES CUNHA DE SOUZA

**Micropoluentes orgânicos emergentes em esgoto sintético tratado por reatores anaeróbios:
efeitos tóxicos em invertebrados aquáticos nativos de regiões tropicais**

Versão Corrigida
São Carlos
2022

TALLYSON TAVARES CUNHA DE SOUZA

Micropoluentes orgânicos emergentes em esgoto sintético tratado por reatores anaeróbios de duplo estágio: efeitos tóxicos em invertebrados aquáticos nativos de regiões tropicais

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

Versão Corrigida

São Carlos

2022

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

S719m Souza, Tallyson Tavares Cunha de
Micropoluentes orgânicos emergentes em esgoto
sintético tratado por reatores anaeróbios: efeitos
tóxicos em invertebrados aquáticos nativos de regiões
tropicais / Tallyson Tavares Cunha de Souza; orientador
Juliano José Corbi. São Carlos, 2022.

Dissertação (Mestrado) - Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e
Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2022.

1. Água residuária. 2. Antibióticos. 3.
Anti-inflamatórios. 4. Cladocera. 5. Ecotoxicologia
aquática. 6. Espécies nativas. 7. Oligochaeta. I.
Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **TALLYSON TAVARES CUNHA DE SOUZA**.

Título da dissertação: "Micropoluentes orgânicos emergentes em esgoto sintético tratado por reatores anaeróbios: efeitos tóxicos em invertebrados aquáticos nativos de regiões tropicais".

Data da defesa: 03/06/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

APROVADO

Prof. Dr. **Leonardo Rios**
(Universidade de Araraquara/UNIARA)

APROVADO

Prof. Dr. **Felipe André dos Santos**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Tupã)

APROVADO

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

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois tudo isso só foi possível graças ao seu amor, cuidado e misericórdia.

Também sou grato aos meus pais, Lucineide e Lucinaldo, e aos meus avós, Maria José e José Alves, por me possibilitarem a melhor formação possível, apoio, dedicação e por sempre acreditarem em mim, até mesmo quando eu me abalava. Também agradeço às minhas irmãs, Thainá e Kat, e ao meu filho de quatro patas Thor (in memoriam). Amo muito vocês.

Destaco com muito carinho a participação dos meus amigos nessa trajetória, que levo da graduação para a vida: Adrielle, Dani, Amanda e Deborah. Agradeço eternamente, a Lucas e Thalita, por serem os melhores amigos que alguém poderia ter. Com vocês eu aprendi muito sobre a vida e como torna-la mais leve. Obrigado!

Não poderia deixar de mencionar a importância do grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia em Ambientes Aquáticos (LEAA-USP). Em especial, agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório, Gleyson, Fernanda, Daniel, Lidia, Mayara e Aline, por todas as dicas, suporte, apoio nos experimentos, auxílio nas revisões, caronas e momentos de fofoca. Vocês tornaram esses dois anos (em plena pandemia) extremamente mais leves.

Sou amplamente grato pela família que me acolheu em São Carlos, os “Matsuda-Ziago” (Eduardo Keiske, Otávio, Cristina, seu Eduardo e Dona Terezinha). Agradeço por todos os inúmeros momentos felizes que me proporcionaram. Também agradeço aos meus colegas de apartamento Murilo e Fabiano, que se tornaram valorosos amigos.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Juliano José Corbi, por todos os ensinamentos, cuidado, compreensão, conselhos e orientação. Sou grato por ter conseguido dividir comigo pelo menos um pouco da sua imensa sabedoria. Também agradeço especialmente ao pesquisador Rodrigo Braz Carneiro, pela parceria, o que possibilitou a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a equipe do PPGSHS, em especial à SÁ e Rose, por toda disponibilidade, suporte e paciência. Também sou grato ao CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado (processo: 131664/2020-4), que me possibilitou realizar esse grande sonho em São Carlos.

“O que nos causa problemas não é o que não sabemos. É o que temos certeza que sabemos e que, no final, não é verdade”

Mark Twain

RESUMO

SOUZA, T. T. C. (2022). **Micropoluentes orgânicos emergentes em esgoto sintético tratado por reatores anaeróbios de duplo estágio: efeitos tóxicos em invertebrados aquáticos nativos de regiões tropicais**. 2022. 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Os impactos dos micropoluentes orgânicos emergentes (MPOs) em matrizes ambientais têm se destacado nas últimas décadas, já tendo sido detectados em concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$ em ambientes aquáticos continentais. São substâncias que, embora possuam elevadas taxas de consumo, ainda não têm seu lançamento e controle em corpos receptores regulamentados, apesar de sua principal via de acesso aos corpos hídricos serem as águas residuárias domésticas. Ademais, os efeitos da exposição desses poluentes à biota aquática e à saúde humana ainda são pouco compreendidos. Diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo analisar os efeitos tóxicos de esgoto sintético contendo 9 MPOs (nas classes: antibióticos, anti-inflamatórios, bloqueadores e parabenos), tratados por reatores anaeróbios de estágio único (metanogênico) e duplo estágio (fase acidogênica e metanogênica separadas), em três espécies nativas de ambientes tropicais: *Ceriodaphnia silvestrii*, *Pristina longiseta* e *Allonais inaequalis*. Foram realizadas análises de toxicidade aguda (diluições de 6; 12,5; 25; 50 e bruto - 100%) e crônica (diluições de 6; 12,5; 25; 50, 75%, para *P. longiseta* e *A. inaequalis*; 0,78; 1,56; 3,1; 6 e 12,5%, para *C. silvestrii*). Na etapa sem MPOs, o reator de duplo estágio (etapa metanogênica – M2) foi responsável pelas maiores concentrações letais e de efeito (menor toxicidade), com CL_{50} médio de 44,6% para os bentônicos, e CE_{50} de 35,4% para o microcrustáceo. *Pristina longiseta* foi o organismo mais sensível às exposições agudas, e *C. silvestrii* a espécie mais sensível durante as exposições crônicas. A adição de MPOs no esgoto acarretou em maiores efeitos tóxicos aos organismos, com *C. silvestrii* (CE_{50} entre 1,33 e 5,96%, para as exposições com amostras dos três reatores) se mostrando extremamente mais sensível às exposições de toxicidade crônica, seguido de *A. inaequalis* (CE_{50} entre 10,7 e 24%, para as exposições com amostras dos três reatores) e *P. longiseta* (CE_{50} entre 10,5 e 32%, para as exposições com amostras dos três reatores). No geral, a separação de fases para as amostras com MPOs acarretou em diminuição da toxicidade (tanto aguda, quanto crônica) para o tratamento metanogênico (reator M2), em comparação com a amostra do reator de fase única (M1), nas

exposições com *C. silvestrii* e *A. inaequalis*, podendo haver relação nesse caso, com a geração de subprodutos mais tóxicos na etapa metanogênica do tratamento. Nesse contexto, o tratamento no reator de fase única (M2) apresentou a maior eficiência na redução da toxicidade aguda (59,8%; 68,7%; 75,1%, para *C. silvestrii*, *P. longiseta* e *A. inaequalis*, respectivamente) e crônica (38%; 75%; 49%, para *C. silvestrii*, *P. longiseta* e *A. inaequalis*, respectivamente), em comparação à amostra afluenta. Embora o tratamento anaeróbio tenha sido eficiente, não foi suficiente para remover a toxicidade total das amostras (bruto – 100%), sendo recomendado nesse caso, tratamento posterior.

Palavras-chave: Água residuária; Antibióticos; Anti-inflamatórios; Cladocera; Ecotoxicologia aquática; Espécies nativas; Oligochaeta.

ABSTRACT

SOUZA, T. T. C. (2022). **Emerging organic micropollutants in synthetic sewage treated by two-stage anaerobic reactors: toxic effects on aquatic invertebrates native to tropical regions.** 2022. 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The impacts of emerging organic micropollutants (MPOs) on environmental matrices have been highlighted in recent decades, having already been detected in concentrations of the order of $\mu\text{g/L}$ in continental aquatic environments. These are substances that, despite having high consumption rates, still do not have their release and control in regulated receiving bodies, despite their main access route to water bodies being domestic wastewater. Furthermore, the effects of exposure to these pollutants on aquatic biota and human health are still poorly understood. Therefore, the present research aimed to analyze the toxic effects of synthetic sewage containing 9 MPOs (in the classes: antibiotics, anti-inflammatory, blockers, and parabens), treated by single-stage (methanogenic) and double-stage (acidogenic) anaerobic reactors. and methanogenic) in three species native to tropical environments: *Ceriodaphnia silvestrii*, *Pristina longiseta*, and *Allonais inaequalis*. Analyzes of acute toxicity (dilutions of 6; 12.5; 25; 50 and 100%) and chronic (dilutions of 6; 12.5; 25; 50 and 75%) were performed for *P. longiseta* and *A. inaequalis*; 0.78; 1.56; 3.1; 6 and 12.5% for *C. silvestrii*). In the stage without MPOs, the double-stage reactor (methanogenic stage – M2) was responsible for the lowest lethal and effect concentrations, with an average LC50 of 44.6% for the benthic, and EC50 of 35.4% for the microcrustacean. *Pristina longiseta* was the most sensitive organism to acute exposures, and *C. silvestrii* was the most sensitive species during chronic exposures. The addition of MPOs in sewage resulted in greater toxic effects on organisms, with *C. silvestrii* (EC50 between 1.33 and 5.96%, for exposures with samples from the three reactors) being extremely sensitive to chronic exposures, followed by *A. inaequalis* (EC50 between 10.7 and 24%, for exposures with samples from the three reactors) and *P. longiseta* (EC50 between 10.5 and 32%, for exposures with samples from the three reactors). Overall, the phase separation for the samples with MPOs resulted in decreased toxicity (both acute and chronic) for the methanogenic treatment (M2 reactor), compared to the single-phase reactor sample (M1), in the exposures with *C. silvestrii* and *A. inaequalis*, and there may be a relationship

in this case with the generation of more toxic by-products in the methanogenic stage of the treatment. In this case, the treatment in the single-phase reactor (M2) showed the highest efficiency in reducing acute toxicity (59.8%; 68.7%; 75.1% for *C. silvestrii*, *P. longiseta*, and *A. inaequalis*, respectively) and chronic (38%; 75%; 49%, for *C. silvestrii*, *P. longiseta* and *A. inaequalis*, respectively), compared to the affluent sample. Although the anaerobic treatment was efficient, it was not enough to remove the total toxicity of the samples (crude - 100%), which is recommended in this case, further treatment.

Keywords: Aquatic ecotoxicology; Antibiotics; Anti-inflammatories; Cladocera; Oligochaeta; Native species; Wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis rotas de fármacos e outros MPOs no meio ambiente	30
Figura 2 - <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (A: visão geral; B: pectén proximal das garras pós-abdominais; Escala: A e B= 500 µm).....	45
Figura 3 - <i>Pristina longiseta</i> (A: visão geral; B: cerdas ventrais; C: cerdas aciculares unicúspides e cerdas capilares serrilhadas; Escala: A= 100 µm; B e C= 10 µm).....	48
Figura 4 - <i>Allonais inaequalis</i> (A: visão geral; B: prostômio; C: cerdas dorsais; Escala: A = 1 mm, B = 150 µm, C = 10 µm).....	50
Figura 5 - Fluxograma geral descrevendo as etapas da metodologia utilizada.....	51
Figura 6 - Desenho esquemático de reator anaeróbico de leito fixo estruturado com fluxo ascendente	53
Figura 7 – Disposição dos reatores anaeróbios em escala de bancada (da direita para a esquerda: Reator de dupla fase (Ac seguida do M2); Reator de fase única (M1))	54
Figura 8 - Água reconstituída para cultivo de <i>C. silvestrii</i> (A: Soluções contendo os reagentes para preparo da água de cultivo; B: Armazenamento da água de cultivo)	56
Figura 9 - Cultivo de <i>C. silvestrii</i> (A: Béqueres contendo exemplares de <i>C. silvestrii</i> em diferentes gerações; e alga <i>R. subcapitata</i> ; B: Exemplar de cultivo de <i>C. silvestrii</i>)..	57
Figura 10 - Cultivo de <i>P. longiseta</i> (A: Recipientes plásticos contendo exemplares de <i>P. longiseta</i> conectado a um sistema de aeração; B: Exemplar de cultivo de <i>P. longiseta</i>)	58
Figura 11 - Cultivo de <i>A. inaequalis</i> (A: Recipientes contendo exemplares de <i>A. inaequalis</i> conectados a um sistema de aeração; B: Exemplar de cultivo de <i>A. inaequalis</i>)	58
Figura 12 - Armazenamento das amostras (A: Recipiente plástico de 5 L; B: Refrigerador utilizado para armazenar as amostras)	60
Figura 13 - Ensaio de toxicidade aguda (A: Exemplo de réplica para ensaios agudos com <i>C. silvestrii</i> ; B: Exemplo de réplica para ensaios agudos com <i>P. longiseta</i> e <i>A. inaequalis</i> ; C: Ensaio realizado em recipientes plásticos).....	62
Figura 14 - Ensaio de toxicidade crônica com <i>C. silvestrii</i> (A: Amostras em 10 réplicas; B: Diluições armazenadas para as trocas do meio; C: Lupa de aumento (8x) para auxiliar na contabilização de neonatos)	64

Figura 15 - Ensaio de toxicidade crônica com <i>P. longisetata</i> e <i>A. inaequalis</i> (A: Ensaio realizado para 4 amostras; B: Estantes utilizadas para acomodação dos bioensaios)	65
Figura 16 - Fluxograma das etapas na análise estatística dos dados	66
Figura 17 - Ensaio de sensibilidade com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (48h)	69
Figura 18 - Ensaio de sensibilidade com <i>Pristina longisetata</i> (48h)	71
Figura 19 - Ensaio de sensibilidade com <i>Allonais inaequalis</i> (96h)	71
Figura 20 - Ensaio de toxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)	80
Figura 21 - Ensaio de toxicidade aguda com <i>Pristina longisetata</i> (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)	83
Figura 22 - Ensaio de toxicidade aguda com <i>Allonais inaequalis</i> (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)	87
Figura 23 - Comportamento de <i>Allonais inaequalis</i>	89
Figura 24 - Ensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)	95
Figura 25 - Ensaio de toxicidade crônica com <i>Pristina longisetata</i> (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)	99
Figura 26 - Ensaio de toxicidade crônica com <i>Allonais inaequalis</i> (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações ambientais de ciprofloxacina e sulfametoxazol em águas superficiais de países de clima tropical	32
Tabela 2 - Efeitos da exposição de antibióticos em organismos aquáticos	33
Tabela 3 - Concentrações ambientais de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) em águas superficiais de países de clima tropical.....	35
Tabela 4 - Efeitos da exposição anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) em organismos aquáticos	36
Tabela 5 - Concentrações ambientais de bloqueadores em águas superficiais.....	38
Tabela 6 - Efeitos da exposição de bloqueadores em organismos aquáticos.....	39
Tabela 7 - Concentrações ambientais de parabenos em águas superficiais	40
Tabela 8 - Efeitos da exposição de parabenos em organismos aquáticos.....	41
Tabela 9 - Espécies de organismos aquáticos de águas continentais padronizados pela ABNT para realização de ensaios ecotoxicológicos.....	43
Tabela 10 - Condições de cultivo mantidas no LEAA	55
Tabela 11 - Características gerais e substância de referência para a realização dos testes de sensibilidade.....	59
Tabela 12 - Características gerais para os testes de toxicidade aguda.....	61
Tabela 13 - Características gerais para os testes de toxicidade crônica.....	65
Tabela 14 - Resultados de monitoramento do sistema durante a etapa 1 – sem adição de MPOs	72
Tabela 15 – Resumo das características das amostras nos ensaios de exposição aguda	74
Tabela 16 - Resumo das características das amostras nos ensaios de toxicidade crônica	75
Tabela 17 - Resultados de monitoramento do sistema durante a etapa 2 – com adição dos MPOs	76
Tabela 18 - Resumo das características das amostras (contendo MPOs) nos ensaios de toxicidade aguda.....	78
Tabela 19 - Resumo das características das amostras (contendo MPOs) nos ensaios de toxicidade crônica.....	79

Tabela 20 – Respostas ecotoxicológicas obtidas após as exposições de toxicidade aguda (48h) de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> às amostras de esgoto com e sem MPOs, expressos em CE ₅₀ e CE ₁₀	81
Tabela 21 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	82
Tabela 22 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após as exposições de toxicidade aguda (48h) de <i>Pristina longiseta</i> às amostras de esgoto com e sem MPOs, expressos em CE ₅₀ e CE ₁₀	85
Tabela 23 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade aguda com <i>Pristina longiseta</i>	85
Tabela 24 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após as exposições de toxicidade aguda (96h) de <i>Allonais inaequalis</i> às amostras de esgoto com e sem MPOs, expressos em CL ₅₀ e CL ₁₀	88
Tabela 25 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade aguda com <i>Allonais inaequalis</i>	88
Tabela 26 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após exposições crônicas (7d) de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> às amostras de esgoto das etapas 1 e 2, expressos em CE ₁₀ , CE ₅₀ , CENO e CEO.....	96
Tabela 27 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	98
Tabela 28 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após exposições crônicas (7d) de <i>Pristina longiseta</i> às amostras de esgoto das etapas 1 e 2, expressos em CE ₁₀ , CE ₅₀ , CENO e CEO.....	100
Tabela 29 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade crônica com <i>Pristina longiseta</i>	101
Tabela 30 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após exposições crônicas (10d) de <i>Allonais inaequalis</i> às amostras de esgoto das etapas 1 e 2, expressos em CE ₁₀ , CE ₅₀ , CENO e CEO.....	104
Tabela 31 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade crônica com <i>Allonais inaequalis</i>	104

Tabela 32 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator Ac.....	137
Tabela 33 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M2.....	137
Tabela 34 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M1	138
Tabela 35 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com <i>C. silvestrii</i> expostos às amostras do reator Ac.....	138
Tabela 36 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com <i>C. silvestrii</i> expostos às amostras do reator M2.....	139
Tabela 37 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com <i>C. silvestrii</i> expostos às amostras do reator M1	139
Tabela 38 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras afluente	140
Tabela 39 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator Ac.....	140
Tabela 40 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M2	141
Tabela 41 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M1	141
Tabela 42 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com <i>C. silvestrii</i> expostos às amostras afluente.....	142
Tabela 43 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com <i>C. silvestrii</i> expostos às amostras do reator Ac.....	142
Tabela 44 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com <i>C. silvestrii</i> expostos às amostras do reator M2.....	143
Tabela 45 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com <i>C. silvestrii</i> expostos às amostras do reator M1	143

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Amostra proveniente do Reator de Dupla Fase (Acidogênico)
AF	Amostra Afluente aos reatores
CENO	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CE _x	Concentração Mediana de Efeito a x% dos organismos
CIP	Ciprofloxacina
CL _x	Concentração Letal Mediana a x% dos organismos
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo
IBF	Ibuprofeno
LEAA	Laboratório de Ecologia em Ambientes Aquáticos
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
M1	Amostra proveniente do Reator de Fase Única (Metanogênico)
M2	Amostra proveniente do Reator de Dupla Fase (Metanogênico)
MET	Metoprolol
MP	Metilparabeno
MPOs	Micropoluentes Orgânicos Emergentes
NF	Nonilfenol

NPX	Naproxeno
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCM	Paracetamol
PP	Propilparabeno
RALF	Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado
RALFO	Reator Anaeróbio de Leito Fixo Ordenado
SMX	Sulfametoxazol
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	26
2.1 Hipótese.....	26
2.2 Objetivo Geral	26
2.2.1 Objetivos Específicos.....	26
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.1 Micropoluentes orgânicos emergentes (MPOs).....	27
3.2 Impactos dos MPOs	30
3.2.1 Antibióticos.....	31
3.2.2 Anti-inflamatórios.....	33
3.2.3 Bloqueadores.....	36
3.2.4 Parabenos	40
3.3 Ensaio ecotoxicológico com organismos aquáticos.....	42
3.4 Organismos de interesse.....	44
3.4.1 <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (Crustacea, Cladocera: Daphniidae)	44
3.4.2 <i>Pristina longiseta</i> (Oligochaeta: Naididae)	46
3.4.3 <i>Allonais inaequalis</i> (Oligochaeta: Naididae).....	49
4. METODOLOGIA.....	51
4.1 Descrição geral da metodologia.....	51
4.2 Área de estudo.....	52
4.3 Esgoto doméstico sintético.....	52
4.4 Organismos – teste: cultivo e manutenção.....	54
4.4.1 <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	55
4.4.2 <i>Pristina longiseta e Allonais inaequalis</i>	57
4.5 Testes de Sensibilidade	58
4.6 Ensaio Ecotoxicológico.....	59
4.6.1 Ensaio de toxicidade aguda	60
4.6.2 Ensaio de toxicidade crônica.....	63
4.7 Análises estatísticas.....	66
4.8 Expressão dos Resultados	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69

5.1	Testes de sensibilidade	69
5.2	Caracterização das amostras.....	72
5.2.1	Etapa 1 – Esgoto sintético sem MPOs	72
5.2.2	Etapa 2 – Esgoto sintético contendo MPOs	76
5.3	Ensaio de toxicidade aguda	79
5.3.1	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	79
5.3.2	<i>Pristina longiseta</i>	82
5.3.3	<i>Allonais inaequalis</i>	85
5.3.4	Impactos ecotoxicológicos.....	90
5.4	Ensaio de toxicidade crônica	93
5.4.1	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	93
5.4.2	<i>Pristina longiseta</i>	98
5.4.3	<i>Allonais inaequalis</i>	101
5.4.4	Impactos ecotoxicológicos.....	104
6.	CONCLUSÕES.....	109
6.1	Perspectivas Futuras.....	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
	APÊNDICES	137
	Apêndice A – Monitoramento dos parâmetros químicos durante os bioensaios da etapa 1 (sem MPOs)	137
	Apêndice B – Monitoramento dos parâmetros químicos durante os bioensaios da etapa 2 (contendo MPOs)	140

1. INTRODUÇÃO

As problemáticas ambientais têm se agravado nas últimas décadas, com o crescimento da população mundial e as mudanças nos hábitos de consumo, motivadas pelo processo de globalização e avanço da indústria (ANTONIOU; ZORPAS, 2019). A produção de resíduos gerados no planeta nunca foi tão alta e os impactos dos diferentes poluentes que são introduzidos diariamente nos ecossistemas ainda não são completamente compreendidos (POLLI; KUHNEN, 2011). Nesse contexto, os poluentes de interesse emergente têm ganhado destaque. São substâncias que possuem elevada taxa de produção e consumo, difícil quantificação em matrizes ambientais, falta de regulamentação no controle e lançamento em corpos receptores, e efeitos no meio ambiente ainda desconhecidos (DEBLONDE et al., 2011; RICHARDSON et al., 2016).

Os fármacos, parabenos, microplásticos, pesticidas e surfactantes são algumas das classes que fazem parte desse grupo de contaminantes e têm como principal via de acesso aos corpos hídricos as águas residuárias domésticas (JIANG et al., 2013; CULLY, 2014; YACOUBA et al., 2021). A preocupação global acerca da crescente presença desses poluentes em matrizes ambientais está relacionada não só as suas ações individuais, mas também com a falta de conhecimento acerca da sinergia entre os diferentes contaminantes e os efeitos causados à saúde humana e à biota (PARK; CHOI, 2008; DAGHRIR; DROGUI, 2013; TIJANI et al., 2016). Diante disso, o desafio atual é adaptar ou desenvolver tecnologias que sejam capazes de remover esses compostos, de forma que se diminua as concentrações que chegam no meio ambiente, já que as estações de tratamento de águas residuárias convencionais não foram projetadas para eliminação desses xenobióticos (DEBLONDE et al., 2011). Diversos pesquisadores têm investigado com sucesso a biotransformação em sistemas biológicos anaeróbios de compostos emergentes em concentrações ambientalmente relevantes (os fármacos sulfametoxazol, ciprofloxacina e oxitetraciclina, por exemplo). Porém, os estudos relacionados à biotransformação da mistura de diferentes compostos em águas residuárias ainda são pouco desenvolvidos (GONZALEZ-GIL et al., 2018; CARNEIRO et al., 2019; LIAN et al., 2021; CARNEIRO et al., 2022).

Os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas utilizadas para avaliar os efeitos potenciais de substâncias isoladas e suas misturas aos seres vivos. Esses bioensaios devem ser realizados de maneira combinada com as análises físicas e químicas que já são rotineiramente empregadas na

avaliação de sistemas de tratamento de águas residuárias, de modo a se obter uma caracterização mais completa dos efluentes, englobando também os seus possíveis efeitos tóxicos na biota (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; ROSNER et al., 2021). Nesse contexto, embora as concentrações de micropoluentes orgânicos emergentes (MPOs) detectadas em águas superficiais ainda estejam na ordem $\mu\text{g/L}$, diversos estudos têm relacionado essas concentrações ambientalmente relevantes dos MPOs à efeitos crônicos observados em organismos aquáticos, tendo como destaque, as malformações, alterações no ciclo reprodutivo, estresse oxidativo, interferências em genes biomarcadores do sistema endócrino, além de outras alterações fenotípicas (BRANDHOF et al., 2010; DU et al., 2016; TOKANOVÁ et al., 2016; DAMBAL et al., 2017; KIM et al., 2017; OGUEJI et al., 2018; RÍOS e al., 2022).

É importante ressaltar a necessidade de selecionar organismos-teste que sejam grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas aquáticos, assim como também levar em consideração os critérios de sensibilidade, disponibilidade do organismo na região, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, ciclo de vida curto e estabilidade genética (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Dessa forma, os invertebrados aquáticos têm sido organismos amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos, devido principalmente à sua fisiologia e importância na cadeia trófica. Além disso, Rand et al (1995), destacam a importância de se considerar o local específico do problema a ser solucionado, objetivando a utilização de organismos em testes ecotoxicológicos que de fato representem a sua biota, evidenciando a necessidade da utilização de organismos nativos do local onde possam ocorrer os lançamentos, no caso das águas residuárias.

Assim, na presente pesquisa foram selecionadas três espécies nativas brasileiras de águas continentais pertencentes à duas diferentes classes: *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Oligochaeta: Naididae); *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae); *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera: Daphniidae). Sendo a *Pristina longiseta* um organismo bentônico, tendo todo seu ciclo de vida associado ao sedimento; *Allonais inaequalis*, uma Oligochaeta bentônica de vida livre, estando associado tanto a coluna d'água quanto ao sedimento; já o microcrustáceo *Ceriodaphnia silvestrii* tem seu ciclo de vida associado apenas a coluna d'água. Para analisar, em condições de diluição da água residuária afluenta e efluente à reatores anaeróbios de duplo estágio e de estágio único, os impactos ecotoxicológicos

de esgoto doméstico sintético contendo nove micropoluentes orgânicos emergentes (divididos entre as classes: antibióticos, anti-inflamatórios, bloqueadores e parabenos) a partir de exposições de toxicidade aguda e crônica.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

O presente trabalho se fundamenta na hipótese que o esgoto sintético contendo nove micropoluentes orgânicos emergentes (MPOs) é tóxico para os invertebrados aquáticos, e que os Reatores Anaeróbios de Leito Estruturado, em escala de bancada, reduzem a sua toxicidade.

2.2 Objetivo Geral

Analisar os efeitos tóxicos de esgoto sintético contendo micropoluentes orgânicos (antibióticos, anti-inflamatórios, bloqueadores e parabenos), pré e pós reatores anaeróbios de duplo estágio (acidogênico seguido de metanogênico) e estágio único (metanogênico), para três espécies nativas e de relevância ecológica em ambientes tropicais: *Pristina longiseta* (Oligochaeta: Naididae), *Allonais inaequalis* (Oligochaeta: Naididae) e *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea, Cladocera: Daphniidae).

2.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade das amostras tratadas de esgoto sintético sem adição dos micropoluentes em *Pristina longiseta*, *Allonais inaequalis* e *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Analisar o efeito da toxicidade aguda de amostras brutas e tratadas de esgoto sintético contendo MPOs em *Pristina longiseta*, *Allonais inaequalis* e *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Analisar o efeito da toxicidade crônica de amostras brutas e tratadas de esgoto sintético contendo MPOs na reprodução de *Pristina longiseta*, *Allonais inaequalis* e *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Avaliar a eficiência dos Reatores Anaeróbios de Leito Estruturado de duplo estágio (acidogênico-metanogênico) e de estágio único (metanogênico) na redução da toxicidade das amostras contendo micropoluentes orgânicos para a biota aquática.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Micropoluentes orgânicos emergentes (MPOs)

Os estudos relacionados à contaminação do meio ambiente por poluentes emergentes vêm ganhando destaque nas últimas décadas, principalmente quando avaliada a qualidade dos ecossistemas aquáticos, estando a crescente presença desses compostos nos corpos hídricos associada não só a fontes de poluição pontual, mas também à ineficácia dos sistemas convencionais de tratamento de águas residuárias em sua completa remoção (DEZOTTI et al., 2003; ZENKER et al., 2014; BUNKE et al., 2019). No Brasil, o monitoramento desses contaminantes ainda não é realizado de forma sistemática e contínua, tendo em vista que não há exigências de investigação da maior parte dos poluentes pertencentes ao grupo dos emergentes através das legislações ambientais vigentes (BILA; DEZOTTI, 2003; MONTAGNER et al., 2017). Além disso, a nível global, as técnicas para a avaliação e quantificação desses poluentes ainda estão sendo compreendidas e desenvolvidas, dado o nível de sensibilidade necessária dos equipamentos para detectar as baixas concentrações em que se encontram no meio e os subprodutos gerados durante os processos de tratamento (PAL et al., 2014; ZHOU et al., 2019).

Existem diversos contaminantes dentro dessa classificação e embora as suas concentrações ainda sejam baixas na natureza, esses compostos podem causar uma série de impactos para os ecossistemas em que se encontram, sendo capazes de causar alterações no ciclo de vida, reprodução e, conseqüentemente, impactos na cadeia trófica dos organismos (RICHARDSON et al., 2016; MONTAGNER et al., 2017). Os compostos desse grupo são os mais diversos, se destacando, os defensivos agrícolas, fertilizantes, hormônios, microplásticos, cianotoxinas, produtos de higiene pessoal, fármacos de uso humano e veterinário, dentre outros (BILA; DEZOTTI., 2007; PAL et al., 2014; RICHARDSON et al., 2016). Com o aumento da demanda por produtos de caráter terapêutico e cuidados pessoais, além do amplo desenvolvimento da indústria farmacêutica, o acesso à diferentes tipos de produtos tem se intensificado ao redor do globo, tendo como efeito colateral uma séria problemática ambiental envolvendo os ecossistemas aquáticos continentais, já que o destino final destes produtos acaba sendo os corpos hídricos (BILA; DEZOTTI, 2003; FILHO et al., 2007; CHANG et al., 2020; BOLUJOKO et al, 2021).

As substâncias farmacêuticas no corpo humano e animal passam por processos de biotransformação, podendo ser liberadas no ambiente na forma não-metabolizada ou como um metabólito ativo, os quais podem ser excretadas através das fezes e urina de humanos e animais. O efeito desses xenobióticos nos indivíduos é determinada principalmente pela sensibilidade dos organismos, via de exposição, concentração do poluente e exposição a múltiplos contaminantes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; BOTTONI et al., 2010). Segundo dados da Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa (INTERFARMA) em um relatório publicado em 2020, o mercado farmacêutico brasileiro movimentou cerca de 102,8 bilhões de reais em 2019, apresentando um crescimento de 11,4% em comparação ao ano anterior. Tendo então, o Brasil, o maior mercado consumidor da América Latina, ocupando a 7ª posição na lista dos países que mais consomem esses produtos ao redor do mundo, com projeção para alcançar a 5ª posição até o ano de 2023 (INTERFARMA, 2020; FREITAS; RADIS-BAPTISTA, 2021).

Os medicamentos anti-infecciosos estão entre os produtos farmacêuticos mais consumidos, acompanhados pelos anti-inflamatórios, que são comumente receitados em conjunto com os antibióticos (ARAGÃO et al., 2020; PEÑA et al., 2021). Além disso, segundo a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico OCDE (2019), a expectativa de vida ao envelhecer apresentou diminuição nos últimos anos. A organização afirma que o aumento da obesidade e diabetes tem contribuído para o crescente número de mortes por doenças cardíacas e derrames, o que exemplifica o significativo aumento do consumo de medicamentos betabloqueadores (anti-hipertensivos, antiarrítmicos, remédios para insuficiência cardíaca e outros), que quadruplicou desde o início do século XXI entre os países membros da OCDE (PEÑA et al., 2021).

Com o surgimento da pandemia global de COVID-19, o uso de antibióticos e anti-inflamatórios, além de outros medicamentos, aumentaram consideravelmente em todo mundo, e em consequência, também houve aumento em sua detecção em ambientes aquáticos (GALANARI et al., 2021; KURODA et al. 2021; GWENZI et al., 2022). A preocupação atual acerca do uso indiscriminado, principalmente dos antibióticos, durante a pandemia está vinculada ao surgimento eminente de patógenos mais resistentes aos tratamentos tradicionais (CHEN et al., 2021; KUMAR et al., 2021; GWENZI et al., 2022; LIN et al., 2022; SPIGAGLIA, 2022). Rawson et al. (2020), apontam que se receitou para cerca de 70% dos pacientes diagnosticados com COVID-19,

tratamentos com antibióticos e anti-inflamatórios, embora, a taxa de pacientes que realmente necessitavam destes medicamentos era em média apenas 10% dos casos confirmados.

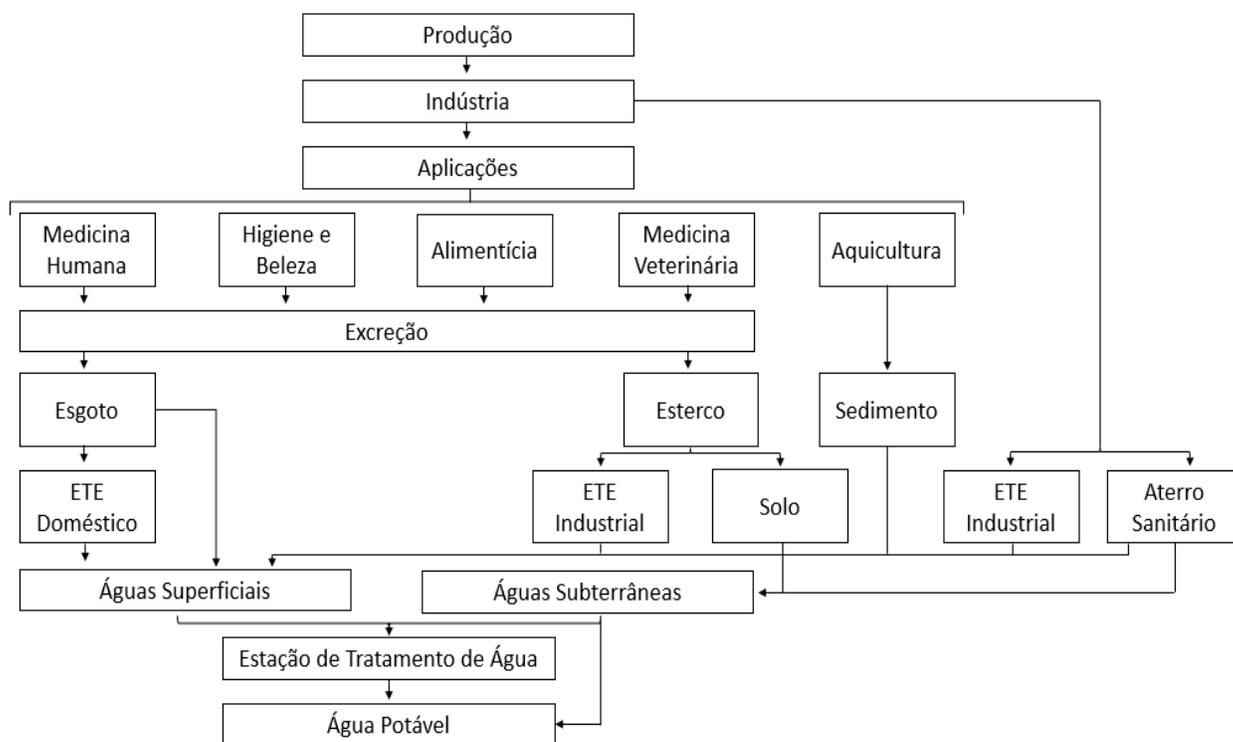
Os parabenos, compostos derivados do ácido p-hidroxibenzoico, têm sido amplamente utilizados como conservantes pelos setores farmacêutico, alimentício e de beleza. Possuem propriedades antimicrobianas e antifúngicas, além de apresentarem menor custo que outros conservantes sintéticos e melhor eficiência que conservantes naturais (FAGGIO et al., 2016; MASHILE et al., 2020; NOWAK et al., 2021; AL-HALASEH et al., 2022). Anualmente, são consumidos uma média de 8.000 toneladas de parabenos ao redor do mundo (BEREKETOGLU; PRADHAN, 2019) e embora estejam em baixas concentrações nos produtos, o excessivo consumo atual acarreta em maior exposição e, conseqüentemente, maiores danos à saúde e ao meio ambiente (TAVARES et al., 2009; MATWIEJCZUK et al., 2020; AL-HALASEH et al., 2022).

Diversas restrições ao uso desses conservantes foram aplicadas ao redor do globo por conta do seu potencial impacto à saúde humana (BEREKETOGLU; PRADHAN, 2019; THAKKAR et al., 2022). A União Europeia, por exemplo, banuiu uma série de compostos da classe (isopropilparabeno, isobutilparabeno, fenilparabeno, benzilparabeno e pentilparabeno), além de restringir as concentrações nos produtos (0,4% até 8%) e proibir sua associação à produtos destinados a crianças menores de 3 anos. Entretanto, no Brasil, os únicos compostos proibidos para uso são os benzilparabeno e o pentilparabeno (EUROPEAN UNION REGULATION n° 1223/2009; WANG et al., 2020; NOWAK et al., 2021).

Existem inúmeras rotas que tendem a transportar os micropoluentes para os ecossistemas aquáticos, e a maioria delas têm relação com o esgoto doméstico. Seja através da falta de coleta e tratamento de esgoto, possíveis vazamentos no sistema de águas residuárias, o que acarreta em fontes de poluição difusa, ou pela não remoção desses contaminantes em sua totalidade nos sistemas de tratamento de águas residuárias convencionais (BILA and DEZOTTI, 2003; KANAUIYA et al., 2019; PISHARODY et al., 2022). Segundo dados do relatório “Atlas dos Esgotos” da Agência Nacional das Águas (BRASIL, 2017), apenas 43% da população brasileira possui seu esgoto coletado e devidamente tratado, isto equivale ao lançamento diário de 4,1 toneladas de esgoto sem tratamento em corpos hídricos. O mesmo relatório também indica que mais de 110 mil km de trechos de rios estão com a qualidade para captação comprometidos por conta do lançamento excessivo de esgoto bruto.

Além disso, também existem outras rotas relacionadas ao uso e lançamento de resíduos contendo fármacos no meio ambiente, por exemplo, o aproveitamento do esterco animal como fertilizante na agricultura, uso de antibióticos na aquicultura, a disposição final de resíduos domésticos e industriais, entre outros (EBELE et al., 2017; QUADRA et al., 2022). Entretanto, as principais vias de acesso dos MPOs aos ambientes aquáticos ainda se dá através de efluentes de estação de tratamento de águas residuárias domésticas, efluentes hospitalares, efluentes industriais e do lançamento direto de esgoto doméstico em corpos hídricos (FUENTEFRÍA et al., 2011; BUNKE et al., 2019; BÖGER et al., 2021). Na figura 1 é possível identificar algumas das possíveis trajetórias de MPOs no meio ambiente (BILA; DEZOTTI, 2003; AMÉRICO et al., 2013; ZHANG et al., 2013; KLEIN et al., 2018; CHOW et al., 2021).

Figura 1 - Possíveis rotas de fármacos e outros MPOs no meio ambiente



Fonte: Adaptado de BILA; DEZOTTI, 2003.

3.2 Impactos dos MPOs

3.2.1 Antibióticos

Os antibióticos são amplamente utilizados para o tratamento de inúmeras doenças, não só humanas e de animais domésticos, mas também na indústria de animais de corte. Estima-se que mundialmente cerca de 50 a 80% dos antibióticos produzidos sejam consumidos no setor pecuário, tanto para tratar e prevenir doenças, como para promover o crescimento dos animais, gerando uma quantidade maior de carne produzida (ZHANG et al., 2013; CULLY, 2014). Segundo Zhu et al. (2013), essas práticas também tem contribuído para o aumento da resistência das bactérias que afetam humanos e animais, já que as excretas animais acabam tendo como destino final o solo e as águas superficiais. No Brasil, o uso dos fármacos para os fins de crescimento animal é controlado e regulamentado, sendo permitido apenas para algumas raças de animais e antibióticos específicos (CARDOSO, 2019; SILVA et al., 2019).

Alguns dos grupos de antibióticos mais comumente encontrados em águas superficiais e subterrâneas são os pertencentes as classes das fluoroquinolonas e sulfonamidas, sendo esses, antimicrobianos sintéticos amplamente empregados na medicina humana, veterinária e agricultura (PEIXOTO et al., 2016; LI et al., 2020). As fluoroquinolonas têm seu mecanismo de ação baseado na inibição do DNA-girase ou da topoisomerase II e IV, que são enzimas essenciais para replicação do DNA, sendo sobretudo, eficazes contra bactérias Gram-negativas (SUZUKI e HOA, 2012; ANVISA, 2017a; SANTOS et al., 2020). Os antibióticos que fazem parte do grupo das sulfonamidas possuem efeito bacteriostático e a sua via de ação consiste na inibição da síntese do ácido fólico pelos microrganismos (GUIMARÃES et al., 2010; ANVISA, 2017b). O primeiro antibacteriano utilizado em tratamento quimioterapêutico no mundo foi uma sulfonamida (sulfacrisoidina), em 1935, sendo essa uma das classes de antibióticos mais usadas ao redor do globo até meados dos anos 1990. Entretanto, desde então, no continente Europeu houve uma redução no seu uso, seja pela produção de antibacterianos mais eficazes, pelos efeitos colaterais registrados em pacientes tratados com esses fármacos ou pelo aumento significativo na resistência microbiana às sulfonamidas, dado o nível de seu consumo (SKÖLD, 2000; GUIMARÃES et al., 2010).

A presença de antibióticos em matrizes aquosas pode ser identificada em todos os continentes do planeta, variando na ordem de $\mu\text{g/L}$ em países desenvolvidos e que possuem legislações restritivas com relação ao uso de fármacos, chegando até as concentrações de ng/L nos

países em desenvolvimento (TIJANI et al., 2016). Na tabela 1, é possível identificar algumas concentrações máximas detectadas de sulfametoxazol (SMX) (sulfonamida) e ciprofloxacina (CIP) (fluoroquinolona) em ambientes aquáticos de países de clima tropical.

Tabela 1 - Concentrações ambientais de ciprofloxacina e sulfametoxazol em águas superficiais de países de clima tropical

Antibiótico	Concentração (µg/L)	Localização	Referência
Ciprofloxacina (CIP)	0,15	Zambia	Ngumba et al. (2020)
	0,19	Brasil	Locatelli et al. (2011)
	0,30	Malásia	Praveena et al. (2018)
	0,74	Costa Rica	Spongberg et al. (2011)
	1,30	Austrália	Watkinson et al. (2009)
	2,80	Quênia	Kairigo et al. (2020)
	5,02	Índia	Gothwal; Shashidhar (2017)
Sulfametoxazol (SMX)	0,05	Quênia	Kairigo et al. (2020)
	0,12	Brasil	Locatelli et al. (2011)
	0,14	Quênia	Kairigo et al. (2020)
	0,15	Malásia	Praveena et al. (2018)
	0,66	Zambia	Ngumba et al. (2020)
	3,18	Nigeria	Ebele et al. (2020)
	38,85	Quênia	K'oreje et al. (2016)

Fonte: Aatoria própria (2022).

Nesse contexto, diversos autores têm investigado os impactos da toxicidade em exposições a curto e longo prazo dos compostos antimicrobianos na biota aquática. Em função da crescente ascensão das concentrações identificadas no meio ambiente, a preocupação atual não é apenas quantificar os níveis tolerados pelas espécies em ensaios agudos, mas também, observar os efeitos crônicos da exposição dos indivíduos a esses poluentes (DAGHRIR; DROGUI, 2013; WANG et al., 2017; LIU et al., 2018). Tijani et al. (2016) destacam que além da ecotoxicidade letal, estes contaminantes também podem desencadear efeitos de disrupção endócrina nas espécies aquáticas, com possíveis alterações na fisiologia, ciclo reprodutivo, sensibilidade, culminando em desequilíbrio ecológico. Na tabela 2 é possível observar alguns estudos dedicados à análise dos efeitos ecotoxicológicos de antibióticos (sulfonamidas e fluoroquinolonas) em diferentes espécies de organismos aquáticos, assim como às concentrações de efeito (CE₅₀) identificadas pelos autores.

Tabela 2 - Efeitos da exposição de antibióticos em organismos aquáticos

Antibióticos	Organismo	Espécie	Efeitos	CL ₅₀ /CE ₅₀ (mg/L)	Referência
Ciprofloxacina (CIP)	Microalga	<i>R. subspicata</i>	Inibição do crescimento	0,008	Ebert et al. (2011)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Mortalidade	13,00	Bona et al. (2015)
	Sapo	<i>R. arenarum</i>	Estresse oxidativo	10,00	Peltzer et al. (2017)
	Crustáceo	<i>G. fossarum</i>	Mortalidade	13,60	Konschak et al. (2020)
	Peixe	<i>R. quelen</i>	Genotoxicidade	100,0	Kitamura et al. (2022)
Sulfametoxazol (SMX)	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	123,10	Park; Choi (2008)
	Microcrustáceo	<i>M. macrocopa</i>	Imobilidade	70,40	Park; Choi (2008)
	Peixe	<i>Danio rerio</i>	Dano membrana celular	0,50	Tokanová et al. (2016)
	Microalga	<i>A. fischeri</i>	Inibição da luminescência	50,51	Johansson et al. (2014)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	43,97	Drzymała; Kalkab (2020)
SMX/DCF*	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	13,59	Drzymała; Kalkab (2020)

*Ensaio de mistura com sulfametoxazol e diclofenaco.

Fonte: Autoria própria (2022).

3.2.2 Anti-inflamatórios

Atualmente, a classe dos anti-inflamatórios são os medicamentos mais prescritos por médicos e dentistas no mundo (BISOGNIN et al., 2018; VERAS et al., 2019). Eles atuam inibindo a enzima ciclooxigenase, impedindo a formação de prostaglandina (causadora dos efeitos inflamatórios), e em como resultado, combatem inflamações, febres e dores musculares (STEVENS, 1995; SCHER; PILLINGER, 2016). Embora não sejam um tipo de medicamento de venda controlada (com exceção dos corticoides), seu indiscriminado uso pode acarretar em danos à saúde humana, principalmente relacionadas com o surgimento de lesões, úlceras estomacais, gastrites, problemas no intestino grosso, além de possíveis danos renais (WHITTLE et al., 2003; BJARNASON et al., 2017; LUCAS et al., 2019). Entretanto, Bjarnason et al. (2017), afirmam que os estudos acerca dos problemas gastrointestinais em humanos ainda não convergem para um

consentimento científico, já que naturalmente, cerca de 1-30% dos pacientes apresentam, em maior ou menor grau, algum dos sintomas citados anteriormente, mesmo sem tratamento prévio com anti-inflamatórios, indicando prejuízo anterior no sistema digestivo. Alguns estudos também relacionam o uso de anti-inflamatórios a problemas cardíacos em adultos e má formação fetal (BLEUMINK et al., 2003; ANTONUCCI et al., 2012; ELHAFEEZ et al., 2019).

Os anti-inflamatórios são divididos entre esteroides (corticoides) (AIEs) e não esteroides (AINEs). Os medicamentos esteroides são principalmente recomendados para tratar inflamações acarretadas por doenças autoimunes, sendo necessário, para alguns tipos deste medicamento a venda apenas por prescrição médica. Já os anti-inflamatórios não esteroides, compreendem a classe dos medicamentos de uso livre, utilizados para tratar processos inflamatórios mais comuns (HARRIS et al., 2007; LUCAS et al., 2019). Segundo Pinheiro e Wannmacher (2012), o ibuprofeno, naproxeno, nimesulida e diclofenaco são os fármacos da classe não esteroides mais comercializados, e por consequência, também são os mais detectados em águas superficiais (PAROLINI, 2020).

O acetaminofeno (paracetamol) é considerado um integrante do grupo dos anti-inflamatórios (AINEs), embora não possua exatamente as mesmas propriedades (CASTRO, 2014; AYOUB, 2021). Seu mecanismo de ação, mesmo que não totalmente elucidado, também envolve a inibição da enzima ciclooxygenase, mas apresenta um baixo potencial anti-inflamatório (AYOUB, 2021; ESH et al., 2021; WEINSTEIN et al., 2021). Embora possua ampla utilização e seja considerado um remédio farmacologicamente seguro, sendo até mesmo inserido na formulação muitos de outros medicamentos, é um dos fármacos que mais culminam em envenenamentos por super dosagens, podendo acarretar problemas hepáticos graves, sendo observadas lesões no fígado de humanos após dosagens diárias acima de 10g (SCHRÖR, 2007; HODGMAN; GARRARD, 2012).

Por consequência, os anti-inflamatórios também são frequentemente detectados em ambientes aquáticos e águas residuárias de estações de tratamento de efluentes (ETEs) ao redor de todo o globo, podendo ser identificados concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$. Na tabela 3, encontram-se algumas concentrações máximas detectadas de ibuprofeno (IBF), naproxeno (NPX), diclofenaco (DCF) e paracetamol (PCM) em ambientes aquáticos de países de clima tropical.

Tabela 3 - Concentrações ambientais de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) em águas superficiais de países de clima tropical

AINEs	Concentração (µg/L)	Localização	Referência
Ibuprofeno (IBF)	0,28	Taiwan	Luo et al. (2014)
	0,40	Costa Rica	Spongberg et al. (2011)
	0,84	Filipinas	Villanueva et al. (2017)
	1,85	Vietnã	Tran et al. (2013)
	6,71	Nigéria	Ebele et al. (2020)
	6,72	África do Sul	Madikizela et al. (2017)
Naproxeno (NPX)	0,001	Brasil	Durán-Álvarez et al. (2015)
	0,19	Nigéria	Ebele et al. (2020)
	0,19	ALC*	Beek et al. (2015)
	0,55	Vietnã	Tran et al. (2013)
	2,77	África do Sul	Madikizela et al. (2017)
Diclofenaco (DCF)	0,11	Brasil	Chaves et al. (2020)
	0,26	Costa Rica	Luo et al. (2014)
	0,95	Vietnã	Tran et al. (2013)
	2,58	África do Sul	Madikizela et al. (2017)
Paracetamol (PCM)	0,24	Nigéria	Ebele et al. (2020)
	0,44	Costa Rica	Spongberg et al. (2011)
	0,73	Costa Rica	Ramírez-Morales et al. (2021)
	1,72	Brasil	Chaves et al. (2020)
	5,80	África do sul	Agunbiade; Moodley (2014)

*ALC: Países da América Latina e Caribe

Fonte: Aatoria própria (2022).

Alguns estudos acerca dos efeitos AINEs em organismos aquáticos destacam que apenas em elevadas concentrações (não detectadas em ambientes naturais) é possível constatar efeito letal dos indivíduos. Entretanto, em concentrações ambientalmente relevantes, já foram atestados efeitos crônicos e subcrônicos, acarretando em inibição da expressão de alguns genes, estresse oxidativo e alterações no ciclo reprodutivo de organismos aquáticos (ŽUR et al., 2018; PAROLINI, 2020). Os estudos em diferentes organismos aquáticos indicam que o ibuprofeno e diclofenaco apresentam maior toxicidade, seguidos do naproxeno e paracetamol (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeitos da exposição anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) em organismos aquáticos

AINEs	Organismo	Espécie	Efeitos	CL ₅₀ /CE ₅₀ (mg/L)	Referência
Ibuprofeno (IBF)	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	23,5	Du et al. (2016)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Reprodução	3,97	Du et al. (2016)
	Peixe	<i>C. gariepinus</i>	Alterações hematológicas	0,43	Ogueji et al. (2018)
	Peixe	<i>D. rerio</i>	Atrasos na eclosão e má formação	2,85	Sánchez-Aceves et al. (2021)
	Microalga	<i>A. fischeri</i>	Inibição do crescimento	18,3	Tyumina et al. (2020)
Naproxeno (NPX)	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Imobilidade e inibição do crescimento	66,37	Isidori et al. (2005)
	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Reprodução	0,33	Li et al. (2016)
	Peixe	<i>D. rerio</i>	Edema pericárdio	98,3	Li et al. (2016)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Estresse oxidativo	0,174	Ríos e al. (2022)
	Microcrustáceo	<i>M. macrocopa</i>	Imobilidade	74,13	Tyumina et al. (2020)
Diclofenaco (DCF)	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	18,1	Du et al. (2016)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Reprodução	2,00	Du et al. (2016)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Nº de ovos	0,52	Du et al. (2016)
Paracetamol (PCM)	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	40,0	Du et al. (2016)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Reprodução	5,32	Du et al. (2016)
	Microcrustáceo	<i>C. silvestrii</i>	Reprodução	0,89	Oliveira et a. (2018)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Reprodução	1,63	Du et al. (2016)

Fonte: Autoria própria (2022).

3.2.3 Bloqueadores

Os medicamentos betabloqueadores fazem parte do grupo de fármacos que atuam no bloqueio dos receptores β (beta), inibindo os efeitos da noradrenalina e, conseqüentemente do sistema nervoso simpático, que é o responsável dentre outras coisas, por regular a pressão arterial (VENKATA; RAM, 2010; WIYSONGE et al., 2017; CHRYSANT, 2021). Nesse contexto, estes medicamentos são indicados principalmente para tratamento de pacientes com ansiedade, hipertensivos, ou com outras doenças cardíacas (DHAKAM et al., 2006; ETTEHAD et al., 2016;

THOMOPOULOS et al., 2016). Segundo Mehvar e Brocks (2001), os betabloqueadores são divididos em dois grupos, os bloqueadores seletivos ou cardioseletivos (inibem o β_1) (ex.: metoprolol, atenolol, esmolol, acebutolol e outros) e os não seletivos (inibem o β_1 e/ou o β_2) (ex.: amosulalol, arotinolol, befunolol, propranolol e outros) (TAFRESHI; WEINACKER, 1999; WONG; GAVIN, 2001).

Embora seus benefícios para a saúde humana sejam inúmeros, os fármacos da classe também podem desencadear efeitos colaterais, principalmente relacionados a alteração na frequência cardíaca, tonturas, dores de cabeça e fadiga (MCAINSH; CRUICKSHANK, 1990; BELL et al., 2015). Em casos menos comuns, pacientes com intolerância aos betabloqueadores hipertensivos podem apresentar casos de hipotensão, com a pressão arterial decaindo muito rápido, mesmo em doses mínimas desses fármacos (OLIVEIRA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2017). Assim, com o aumento do número de casos de doenças mentais, envelhecimento da população mundial, alterações na dieta, com consumo elevado de produtos industrializados e sedentarismo, o uso destes medicamentos têm se ampliado significativamente e, em consequência, sua detecção em ambientes naturais (DERMAN; SCHWELLNUS, 1998; BAKRIS et al., 2006). No caso do metoprolol, cerca de 3 a 10% do fármaco consumido não é metabolizado pelo organismo, sendo excretado em sua forma natural, além dos metabolitos ativos (WILDE, 2011). Nesse contexto, no Brasil já foram detectados em água residuária hospitalar, concentrações médias de 9,9 $\mu\text{g/L}$ do fármaco, sendo em média 3 vezes maior que as detectadas em efluentes domésticos (WILDE; KÜMMERER; MARTINS, 2012).

A carbamazepina (CBZ) é um bloqueador que inibe principalmente a atividade dos canais de sódio, sendo utilizada para tratamentos de epilepsias, neuralgia, transtornos bipolares e outras doenças psicossomáticas (AMBRÓSIO et al., 2002; KANASE et al., 2018). É o segundo medicamento mais recomendado para tratamentos epiléticos no mundo, por conta da sua eficiência, segurança e menor custo. Entretanto, o fármaco possui alguns efeitos colaterais registrados, estando esses, mais relacionados ao uso indevido do CBZ, podendo contribuir para alterações na gestação (antecipação do parto e malformações) e distúrbios do metabolismo ósseo (KANASE et al., 2018; BEYDOUN et al., 2020; XU et al., 2021). Ambrósio et al. (2002) afirmam que esse fármaco é quase completamente metabolizado pelo organismo humano, sendo excretada na forma não metabolizada apenas 1% da dose ingerida. Porém, em ambientes naturais, a

carbamazepina tende a ser mais detectada que outros medicamentos utilizados para tratamentos psicossomáticos (CUNNINGHAM et al., 2010). Na tabela 5 é possível observar algumas concentrações de metoprolol e carbamazepina detectadas em águas superficiais ao redor do mundo.

Tabela 5 - Concentrações ambientais de bloqueadores em águas superficiais

Bloqueador	Concentração (µg/L)	Localização	Referência
Metoprolol (MET)	0,29	Espanha	Siemens et al. (2008)
	0,067	Holanda	Brandhofa; Montfortsb (2010)
	2,20	Alemanha	Triebskorn et al. (2007)
	0,108	China	Asghar et al. (2018)
	0,173	Malásia	Najat et al. (2013)
	0,028	Brasil	Thomas et al. (2014)
	0,028	Brasil	Sodré et al. (2018)
	0,025	China	Kim; Zoh (2016)
Carbamazepina (CBZ)	0,35	Suíça	Tixier et al. (2003)
	1,5	América do Norte	Cunningham et al. (2010)
	0,95*	Suíça	Tixier et al. (2003)
	0,69	Alemanha	Bahlmann et al. (2009)
	0,01	Uruguai	Rojo et al. (2019)
	1000*	China	Zhou et al. (2010)

*Ocorrência na zona de mistura após a ETE

Fonte: Autoria própria (2022).

Rojo et al. (2019), investigaram o efeito bioacumulativo de diferentes fármacos em peixes nativos da América do Sul (*Megaleporinus obtusidens*, *Salminus brasiliensis* e *Prochilodus lineatus*), observando que para todas as classes estudadas, os bloqueadores atenolol e carbamazepina foram os mais frequentemente detectados nos músculos dos organismos aquáticos. Os autores apontam que mesmo para espécies com hábitos alimentares diferentes (onívoros, detritívoros e piscívoros), foi observado bioacumulação desses medicamentos em no mínimo 50% das espécimes de peixes coletadas. Por outro lado, as concentrações detectadas foram no máximo 1µg/kg, não significando sérios impactos para saúde humana, embora não se tenha investigado os efeitos dessas concentrações na saúde da biota.

Por outro lado, Dietrich et al. (2010), constataram que concentrações baixas de metoprolol (1,2 µg/L) acarretaram em diminuição significativa no corpo do microcrustáceo *D. magna*, em ensaios crônicos de gerações, evidenciando o potencial tóxico dessa classe de contaminante até nas menores frações para organismos base de cadeia. Os efeitos observados nesse caso, podem não acarretar em morte ou alterações diretas na reprodução, mas evidenciou-se, que pode haver interferências fenotípicas na espécie Cladocera. Nesse contexto, embora as concentrações médias detectadas em ambientes naturais não sejam tão elevadas quanto os outros fármacos identificados neste trabalho, o metoprolol e carbamazepina também apresentam impactos aos diferentes organismos aquáticos. Diversos autores destacam efeitos agudos em baixas concentrações para organismos Cladocera, microalgas e peixes, sendo um indicador de possíveis efeitos crônicos em concentrações ainda menores (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeitos da exposição de bloqueadores em organismos aquáticos

Bloqueador	Organismo	Espécie	Efeitos	CL₅₀/CE₅₀ (mg/L)	Referência
Metoprolol (MET)	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Imobilidade	20,00	Moermond; Smit (2015)
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	31,00	Brandhoff; Montforts (2010)
	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Imobilidade	8,80	Huggett et al. (2002)
	Microalga	<i>D. subspicatus</i>	Inibição do crescimento celular	7,60	Moermond; Smit (2015)
	Peixe	<i>D. rerio</i>	Atraso na eclosão; deformação da cabeça, e outros	31,00	Brandhof et al. (2010)
	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Imobilidade	8,80	Huggett et al. (2002)
Carbamazepina (CBZ)	Inseto	<i>C. riparius</i>	Emergência	0,68	Heye et al. (2019)
	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Inibição da reprodução	10,00*	Heye et al. (2019)
	Peixe	<i>P. promelas</i>	Mortalidade	37,30	Zind et al. (2021)
	Microalga	<i>P. subcapitata</i>	Inibição do crescimento	6,00	Zind et al. (2021)
	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Inibição da reprodução	0,025*	Ferrari et al. (2003)

*CENO – Menor concentração que não se identifica efeito tóxico

Fonte: Autoria própria (2022).

3.2.4 Parabenos

Por muitas décadas os parabenos têm sido amplamente utilizados como conservantes em inúmeros setores da indústria, estando presente em cerca de 80% de fármacos e produtos de cuidado pessoal, devido seu potencial antimicrobiano, custos de produção reduzidos e baixo potencial de toxicidade para humanos (DARBRE; HARVEY 2014; DERISSO et al., 2020). Entretanto, estudos nas últimas décadas apontam a relação da exposição aos parabenos com desencadeamento de efeitos crônicos em inúmeros organismos, inclusive seres humanos (GOLDEN; GANDY; VOLLMER, 2008; BLEZKA et al., 2015; LINCHO et al., 2021). Segundo Kim e Chevrier (2020), estes conservantes podem produzir interferências no sistema endócrino, por serem estrogênicos e antiandrogênicos, tendo relação com alterações no sistema reprodutor, metabolismo, induzindo a obesidade e podendo ter relação com desenvolvimento de alguns tipos de câncer (FREDERIKSEN et al., 2011; VITKU et al., 2018).

Por terem relação direta com produtos de higiene e cuidados pessoais, o destino final destes contaminantes em sua maioria são as estações de tratamento de esgotos e, conseqüentemente, os ambientes aquáticos (LINCHO et al., 2021; WEI et al., 2021). Nesse contexto, no Brasil, já foram detectados em ETEs concentrações de 0,11 a 170,87 µg/L de metilparabeno e 0,02 a 7.9 µg/L de propilparabeno, com constância de detecção em mais de 80% das amostras estudadas (POMPEI et al., 2019; DERISSO et al., 2020; GALINARO et al., 2021). Na tabela 7 é possível observar algumas concentrações de metilparabeno e propilparabeno em águas superficiais de países de clima tropical.

Tabela 7 - Concentrações ambientais de parabenos em águas superficiais

Parabenos	Concentração (µg/L)	Localização	Referência
Metilparabeno (MP)	1,00	Espanha	Carmona et al. (2014)
	0,104	Taiwan	Kung et al. (2018)
	0,068	China	Sun et al. (2016)
	8,70	Brasil	Galinaro et al. (2021)
	0,84	Brasil	Caldas et al. (2018)

Tabela continua na próxima página

Parabenos	Concentração (µg/L)	Localização	Referência
Propilparabeno (PP)	0,30	Espanha	Carmona et al. (2014)
	0,056	Taiwan	Kung et al. (2018)
	0,069	China	Sun et al. (2016)
	9,50	Brasil	Galinaro et al. (2021)
	0,19	Brasil	Caldas et al. (2018)

Fonte: Autoria própria (2022).

Os parabenos mesmo em baixas concentrações podem acarretar em efeitos para a biota aquática, principalmente relacionados ao sistema endócrino dos organismos. Terasaki et al. (2015) observaram que em ensaios crônicos de misturas com diferentes parabenos, apenas em concentrações inferiores a 1,3 mg/L não houve efeitos tóxicos significativos para as exposições com microcrustáceo *C. dubia*. O que também foi constatado por Dambal et al. (2017), em ensaios crônicos com o peixe *Danio rerio*, os autores verificaram que mesmo as baixas concentrações dos parabenos não causando malformações fenotípicas, há efeito significativo na inibição do gene biomarcador estrogênico Vtg-I. Assim, na Tabela 8 é possível observar alguns efeitos dos parabenos em diferentes organismos aquáticos.

Tabela 8 - Efeitos da exposição de parabenos em organismos aquáticos

Parabenos	Organismo	Espécie	Efeitos	CL ₅₀ /CE ₅₀ (mg/L)	Referência
Metil parabeno (MP)	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	42,72	García et al. (2014)
	Bactéria marinha	<i>V. fischeri</i>	Inibição de luminescência	18,21	García et al. (2014)
	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Reprodução	7,30	Terasaki et al. 2015
	Peixe	<i>D. rerio</i>	Malformação	0,065	Dambal et al. (2017)
	Peixe	<i>O. latipes</i>	Mortalidade	63,00	Yamamoto et al. (2013)
Propil parabeno (PP)	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Imobilidade	2,63	García et al. (2014)
	Bactéria marinha	<i>V. fischeri</i>	Inibição de luminescência	10,99	García et al. (2014)
	Microcrustáceo	<i>C. dubia</i>	Reprodução	2,50	Terasaki et al. 2015
	Microcrustáceo	<i>D. magna</i>	Reprodução	1,2	Yamamoto et al. (2013)

Fonte: Autoria própria (2022).

3.3 Ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos

A Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), que trata da classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e outras providências, especifica no Capítulo III, que corpos de águas classe I e II não deverão apresentar efeito tóxico crônico, nas condições e organismos definidos pelos órgãos ambientais competentes. Já em águas de classe III, a orientação é de que não seja observado efeito agudo nas espécies. Nesse contexto, quando tratamos do lançamento de efluentes em corpos hídricos receptores, a Resolução vigente é a CONAMA 430/2011, que trata das especificações sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, e que elenca a ecotoxicidade como um parâmetro a ser avaliado. Além disso, a Resolução pontua que “o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor” (BRASIL, 2011). Nesse caso, também cabendo aos órgãos ambientais competentes o estabelecimento de critérios e normas para aplicação dos bioensaios.

Entretanto, apenas alguns estados brasileiros do sul e sudeste possuem legislações específicas relacionadas ao controle ecotoxicológicos de efluentes. No estado de São Paulo, a Resolução SMA 03/2000 indica que fica a cargo da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) estabelecer os limites, organismos e métodos de ensaio, através da elaboração de normas técnicas. A Resolução também sinaliza que os limites de toxicidade podem ser reavaliados desde que a entidade solicitante realize estudos em pelo menos três espécies de organismos aquáticos. Dessa forma, a CETESB (2013) preconiza as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), para seleção e padronização de organismos, além de definir critérios de cultivo, realização de bioensaios, expressão dos resultados, coleta e acondicionamento de amostras. Na Tabela 9, estão contidos os organismos aquáticos (água doce) padronizados pela ABNT, assim como as recomendações para realização dos bioensaios.

Tabela 9 - Espécies de organismos aquáticos de águas continentais padronizados pela ABNT para realização de ensaios ecotoxicológicos

Organismo	Espécie	Recomendação de ensaio	Norma
Microcrustáceo	<i>Daphnia</i> spp	Toxicidade aguda	NBR12713
Crustáceo	<i>Hyalella</i> spp	Toxicidade aguda e crônica	NBR15470
Peixes	<i>Danio rerio</i> <i>Pimephales promelas</i>	Toxicidade crônica (ensaios de curta duração)	NBR15499
Algas	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Desmodesmus subspicatus</i> <i>Monoraphidium dybowskii</i> <i>Raphidocelis subcapitata</i>	Toxicidade crônica	NBR12648
Microcrustáceo	<i>Ceriodaphnia</i> spp	Toxicidade crônica	NBR13373
Peixes	<i>Danio rerio</i> <i>Pimephales promelas</i>	Toxicidade aguda	NBR15088
Crustáceo	<i>Mysidopsis juniae</i> <i>Mysidium gracile</i>	Toxicidade aguda	NBR15308

Fonte: Autoria própria (2022).

Em síntese, os ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos consistem na exposição de organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos, de ambientes de água doce, estuarina ou marinha, em diferentes concentrações de substâncias, tendo como objetivo avaliar os seus efeitos em um determinado intervalo de tempo (MAGALHÃES et al., 2008). Segundo Gad (1989), as respostas ecotoxicológicas podem ser classificadas como crônicas ou agudas, como foi possível observar nas recomendações de ensaios para as Normas ABNT. A toxicidade crônica corresponde à resposta a partir de um estímulo prolongado ou contínuo (à longo prazo), podendo abranger parte ou todo ciclo de vida do organismo e tendo como possíveis efeitos as alterações na anatomia e reprodução dos organismos. Já os efeitos agudos representam uma resposta rápida dos organismos, manifestando-se em geral, num intervalo de 0 a 96 horas, onde observa-se efeitos de mortalidade ou de imobilidade (ABNT, 2004).

Os invertebrados aquáticos têm sido um grupo bastante utilizado na realização de ensaios ecotoxicológicos, principalmente por serem organismos representativos, importantes no equilíbrio da cadeia trófica (organismos base de cadeia), abundantes na natureza, facilmente cultivados em laboratório e em casos de reprodução assexuada, garantem estabilidade genética da população (CHAUMOT, 2004; ROSNER et al., 2021). Conseqüente, alguns desses organismos são responsáveis por filtrar continuamente grandes volumes de água (crustáceos e microcrustáceos,

por exemplo), sendo então excelentes indicadores para avaliar os efeitos de poluentes em baixas concentrações no meio, como é o caso dos MPOs (PRICHARD; GRANEK, 2016; ROSNER et al., 2021). Além disso, por serem considerados uma classe de vida mais simples, não há a obrigatoriedade do aval da Comissão de Ética em Pesquisa para uso de animais, sendo esse um tema em amplo debate na academia (POLLO; VITALE, 2019; HOWARD; SYMONDS, 2020; CRESPI-ABRIL; RUBILAR, 2021).

No Brasil, como visto anteriormente, alguns invertebrados de águas continentais possuem métodos de cultivo e realização de ensaios ecotoxicológicos definidos pela ABNT, sendo elas, espécies de algas, crustáceos e microcrustáceos. Por outro lado, para um país de extensão continental como o Brasil, é importante frisar a necessidade da avaliação ecotoxicológica em organismos que de fato sejam representativos para o ambiente local em que ocorram os possíveis lançamentos de efluentes. Sendo necessário então, a ampliação do número de espécies nativas com potencial aplicação em bioensaios, objetivando a investigação dos efeitos tóxicos em organismos que possuam diferentes papéis na cadeia alimentar, abrangendo as respostas tóxicas para uma gama maior em níveis de sensibilidade (RAND, 1995).

3.4 Organismos de interesse

3.4.1 *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea, Cladocera: Daphniidae)

Os Cladocera, conhecidos como “pulgas d’água” por conta da sua natação, são importantes organismos base de cadeia em ambientes aquáticos continentais. Pertencentes a classe zooplancônica, são consumidores primários que se alimentam através da filtração, consumindo matéria orgânica, bactérias e algas (FORRÓ et al., 2008; KARUTHAPANDI; RAO, 2016). Além disso, são organismos cosmopolitas majoritariamente de água doce, tendo sido identificados em todos os continentes, inclusive em regiões polares (FORRÓ et al., 2008; ROCHA et al., 2011). As espécies da ordem Cladocera servem de alimento para peixes e outros crustáceos, contribuindo para o fluxo de energia nos níveis tróficos seguintes, sendo organismo chave na teia alimentar entre espécies produtoras e consumidoras (PANARELLI et al., 2010; KARUTHAPANDI; RAO, 2016; GEBARA et al., 2020).

Ceriodaphnia silvestrii, é uma espécie Cladocera neotropical de microcrustáceo planctônico de água doce, descrito por Daday em 1902, a partir de exemplares coletado na região da Patagônia (JACONETTI, 2005). No Brasil, os organismos já foram catalogados em ambientes lóticos e lênticos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, mas também podem ser observados em outros países da América do Sul, como a Argentina, Paraguai e Uruguai (FONSECA; ROCHA, 2004; NALIATO, 2013; ABNT, 2017; MANSANO et al., 2018). A espécie possui em média entre 0,5 a 0,9 mm de comprimento, podendo chegar em condições de laboratório a um tamanho máximo de 1,04 mm (FONSECA; ROCHA, 2004; BERNEGOSI et al., 2021). Morfologicamente, os organismos possuem tronco circundado por uma carapaça, forma arredondada, olhos grandes na parte posterior da cabeça, 9-12 espinhos na região inferior ao tronco, antenas com 2 seguimentos e bifurcações, além de garras (Figura 2) (LOURDES; ELMOOR-LOUREIRO, 1997; FONSECA; ROCHA, 2004). A reprodução da espécie Cladocera é majoritariamente assexuada, por partenogênese, onde se geram indivíduos clone do progenitor, podendo apenas em situações específicas a reprodução ocorrer sexualmente. O ciclo de vida de *C. silvestrii* dura em média 29,8 dias, com a primeira reprodução entre o terceiro e quarto dia, e um comprimento médio dos neonatos de 0,37 mm (FONSECA; ROCHA, 2004; BERNEGOSI et al., 2021).

Figura 2 - *Ceriodaphnia silvestrii* (A: visão geral; B: pectén proximal das garras pós-abdominais; Escala: A e B= 500 µm)

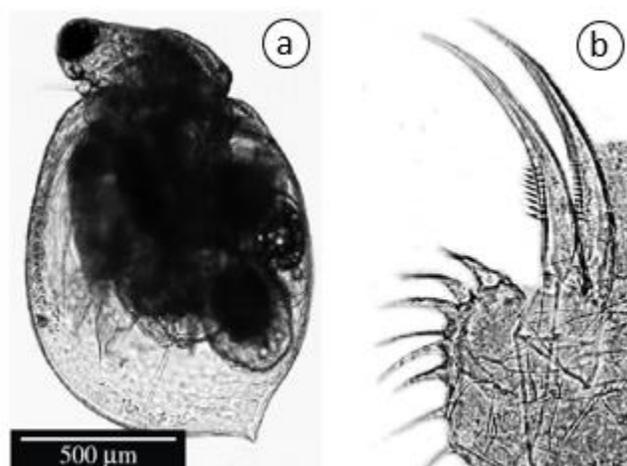


Foto: Adaptado de ABREU et al. (2010).

A espécie neotropical é padronizada no Brasil pela ABNT para realização ensaios ecotoxicológicos em exposições crônicas, podendo também ser empregada para avaliar efeitos de exposições agudas em diferentes contaminantes. É um organismo de alta sensibilidade que tem sido estudada como alternativa aos microcrustáceos padronizados internacionalmente para ensaios ecotoxicológicos *Ceriodaphnia Dubia* e *Daphnia magna* (DAMASCENO de OLIVEIRA et al., 2018; SILVA et al., 2021). Nos últimos anos, *C. silvestrii* tem sido utilizada por pesquisadores brasileiros para investigar efeitos de alguns micropoluentes isolados e em misturas (pesticidas, surfactantes, cafeína, antibióticos, anti-inflamatórios, anti-hipertensivos) com observações de efeitos letais (imobilidade), sobrevivência, desenvolvimento, efeitos na reprodução e ensaios de bioacumulação (SPADOTO et al., 2017; DAMASCENO de OLIVEIRA et al., 2018; FREITAS et al., 2018; PETEFFI et al., 2019; MANSANO et al., 2020; LEITE et al., 2022).

Com relação a sensibilidade da espécie, Damasceno de Oliveira et al (2018), observaram em exposições crônicas e agudas a três fármacos, que *C silvestrii* demonstrou ser mais sensível que as espécies de regiões tropicais *D. magna* e *M. macrocopa*. Entretanto, Casali-Pereira et al. (2015) observaram em exposições agudas e crônicas ao princípio ativo do agente antiparasitário abamectina, que o microcrustáceo foi menos sensível que outras espécies Cladocera, pontuando que para toxicidade de inseticidas e antiparasitários pode haver uma relação entre o tamanho e o efeito no organismo.

3.4.2 *Pristina longiseta* (Oligochaeta: Naididae)

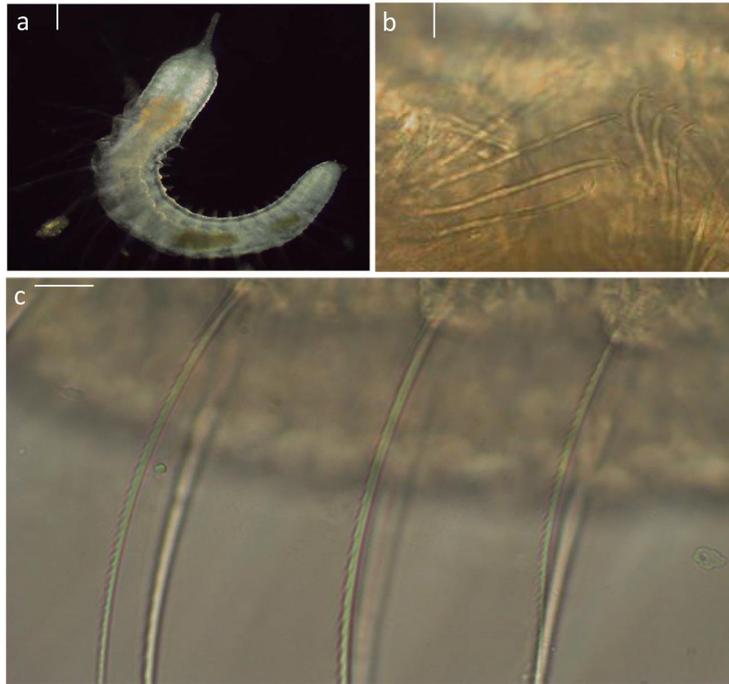
A classe Oligochaeta compreende uma série de espécies de organismos abundantes na natureza, em maioria cosmopolita (CHAPMAN et al., 1982; RAFIA; ASHOK, 2014). Nas últimas décadas minhocas aquáticas têm sido utilizadas em bioensaios ecotoxicológicos, por serem espécies chave em ecossistemas aquáticos, consumidores primários (base de cadeia alimentar), detritívoros, podendo ter contato com poluentes sedimentados através da alimentação ou contato com a pele, sendo capaz de biodisponibilizá-los para os níveis tróficos seguintes (OECD, 2008; LOBO; ESPÍNDOLA, 2014; CORBI et al., 2015). *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911; *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892; *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828; *Tubifex tubifex* Müller, 1774, são algumas das espécies de Oligochaeta aquáticas tropicais das famílias Naididae e

Tubificidae utilizadas com sucesso em ensaios ecotoxicológicos (CHAPMAN et al. 1982; SMITH et al., 1991; PHIPPS et al., 1993; MARCHESE e BRINKHURST, 1996; OCDE, 2008; CORBI et al., 2015; LOBO et al., 2016; FELIPE et al., 2020; CASTRO et al. 2020a).

Pristina longiseta Ehrenberg, 1828 é uma espécie cosmopolita de água doce, e sua ocorrência já foi registrada na Ásia, África, Europa, América do Norte (Estados Unidos da América, México, Canadá), América do Sul (Brasil, Uruguai, Argentina, Colômbia, Bolívia, Peru, Guiana Francesa) e América Central (Cuba) (BRINKHURST; JAMIESON, 1971; HARMAN, 1982; YOON et al., 2000; GORNI et al., 2018; OHTAKA, 2018; CASTRO et al., 2020b; JAWEIR, 2021; GBIF, 2022). A espécie pertence à classe Oligochaeta, família Naididae e seus habitats incluem a região bentônica de águas lênticas e lóticas, tendo seu ciclo de vida associado ao sedimento no ambiente aquático. Possui coloração amarelada translúcida, cerdas nas partes ventral e dorsal e os indivíduos têm em média 1-5 mm de comprimento e 0,11-0,20 mm de largura (Figura 2) (AL-ABBAD, 2010; ZATTARA et al. 2011; GORNI et al. al. 2018; CASTRO et al., 2020b).

De acordo com Van Cleave (1937) e Zattara et al. (2011), a reprodução de *P. longiseta* ocorre principalmente de forma assexuada, por fissão paratômica, formando uma nova cabeça e cauda ao longo do corpo do indivíduo, separando-se após sua formação completa. A reprodução sexuada ocorre apenas na natureza, em situações estressantes como condições ambientais desfavoráveis ou em épocas específicas do ano (VAN CLEAVE, 1937; BRINKHURST; GELDER, 2001; RODRIGUEZ, 2004; ÖZPOLAT, 2016).

Figura 3 - *Pristina longiseta* (A: visão geral; B: cerdas ventrais; C: cerdas aciculares unicúspides e cerdas capilares serrilhadas; Escala: A= 100 μ m; B e C= 10 μ m)



Fonte: CASTRO et al. (2020b).

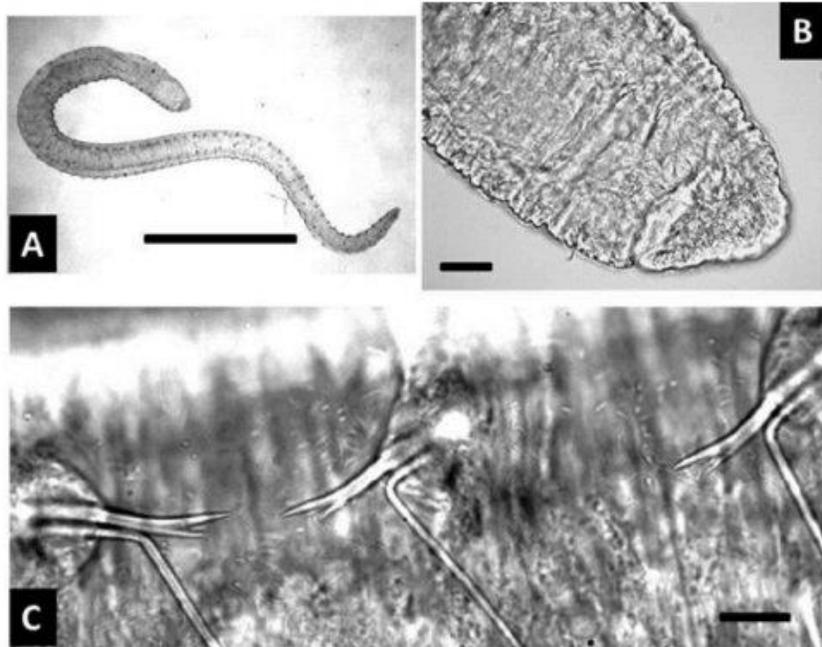
Smith et al. (1991), avaliaram o uso de *Pristina leidy* Smith, 1896 (subespécie do Continente Americano) em bioensaios de exposição aguda utilizando os metais cádmio e vanádio como substâncias teste. Recentemente, Castro et al. (2020b) considerando as condições tropicais, redefiniram o cultivo e manutenção de *P. longiseta* em laboratório e aplicação do organismo em ensaios curta exposição (48h), avaliando os efeitos agudos das substâncias de referência cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre (CuSO_4) e cloreto de zinco (ZnCl_2), obtendo sucesso na elaboração do protocolo de testes para a espécie em questão. No entanto, não existe um protocolo padrão para realização de ensaios de exposição crônica utilizando *P. longiseta*. Nesse contexto, Castro et al. (2020b) ao avaliar o efeito da exposição aguda da substância de referência KCl (CE_{50} de 1,52 g/L), observaram que a espécie foi menos sensível ao contaminante em comparação com os organismos da ordem Cladocera. Porém, *P. longiseta* apresentou maior sensibilidade quando comparado a outros organismos bentônicos (Oligochaeta e larvas de insetos).

3.4.3 *Allonais inaequalis* (Oligochaeta: Naididae)

Allonais inaequalis é uma espécie cosmopolita aquática da família Naididae, que já foi identificada na América do Norte, América Central, América do Sul, África, Sul da Ásia e Oceania (BRINKHURST; JAMIESON, 1971; PATHIRATNE; WEERASUNDARA, 2004; ALVES et al. 2006; PINDER, 2010; CORBI et al., 2015; GOMES et al., 2017; GBIF, 2022). A espécie tem seu ciclo de vida associado ao sedimento e a coluna d'água, sendo um organismo de vida livre (ALVES et al., 2006; CORBI et al., 2015; FELIPE et al., 2020). Além disso, Alves e Gorni (2007), observaram a associação de *A. inaequalis* com espécies de macrófitas submersas em reservatórios no Estado de São Paulo, pontuando que esse ambiente também constitui um importante habitat para a espécie de oligoqueta. *A. inaequalis* possui comprimento corporal entre 3 a 9 mm, ausência de olhos, ausência de cor e presença de cerdas dorsais a partir do segmento VI (Figura 4) (HARMAN et al., 1988; CORBI et al., 2015). Em laboratório, a reprodução da espécie também ocorre majoritariamente de forma assexuada, por fissão paratômica, garantindo estabilidade genética dos cultivos (CORBI et al., 2015; ERSÉUS et al., 2017; FELIPE et al., 2020).

Corbi et al. (2015), definiram as condições de cultivo da *A. inaequalis* em laboratório a partir de exemplares coletados no Parque Ecológico Municipal de São Carlos – SP, e estabeleceram critérios para a realização dos ensaios de toxicidade de curta exposição (96h) utilizando as substâncias de referência cloreto de potássio (KCl) e cloreto de zinco (ZnCl₂). Felipe et al. (2020), sucedendo os estudos do grupo de pesquisa em ecotoxicologia aquática do LEAA (USP), determinaram as condições para realização de testes de longa duração (10d), a partir de ensaios para estabelecer o sistema (estático ou semi-estático), definir condições de aeração, a partir de exposições com as substâncias de referência KCl, ZnCl₂ e sulfato de cobre (CuSO₄). Desde então, outras pesquisas têm sido realizadas utilizando a oligoqueta nativa, indicando o *A. inaequalis* como um organismo sensível a diferentes contaminantes, dentre eles, metais, herbicidas, surfactantes e microplásticos de polietileno (GAZONATO-NETO et al., 2018; ROCHA et al., 2018; FELIPE, 2019; CASTRO et al., 2020b).

Figura 4 - *Allonais inaequalis* (A: visão geral; B: prostômio; C: cerdas dorsais; Escala: A = 1 mm, B = 150 μ m, C = 10 μ m)



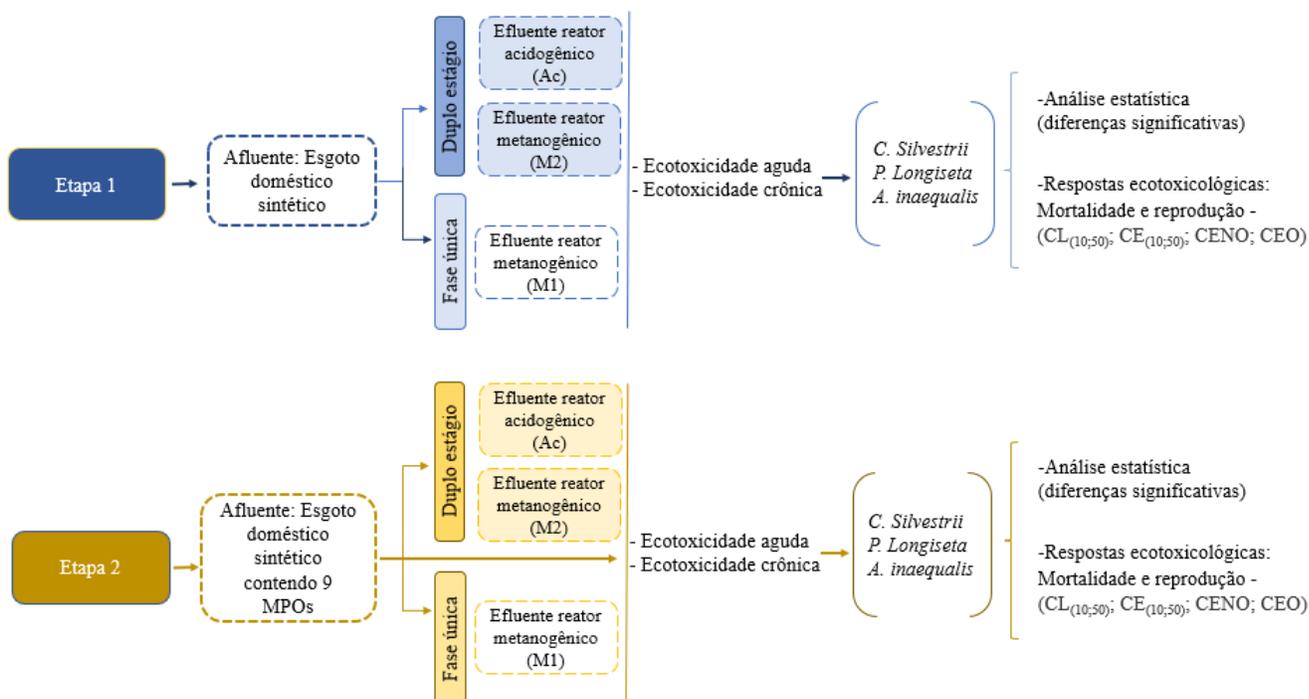
Fonte: CORBI et al. (2015).

4. METODOLOGIA

4.1 Descrição geral da metodologia

A presente pesquisa avaliou a toxicidade de micropoluentes orgânicos emergentes em esgoto sintético, pré e pós reatores de leito fixo estruturado em estágio único e duplo estágio, utilizando três invertebrados aquáticos nativos do Brasil como indicadores ambientais de toxicidade. O objetivo da etapa 1 foi compreender o comportamento dos reatores na redução da toxicidade do esgoto doméstico sintético sem micropoluentes, além de definir as diluições para exposições crônicas. Na etapa 2 foi avaliada o efeito do esgoto sintético doméstico enriquecido com MPOs, e a eficiência dos reatores na redução da toxicidade. Para ambas as etapas foram realizadas análises estatísticas com enfoque em averiguar diferenças significativas entre as diluições e amostras controle. Na Figura 5 é possível observar uma descrição esquemática das etapas realizadas na metodologia.

Figura 5 - Fluxograma geral descrevendo as etapas da metodologia utilizada



Fonte: Autoria própria (2022).

4.2 Área de estudo

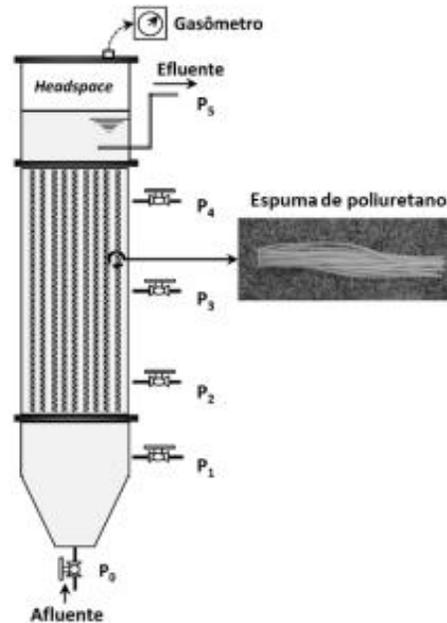
Esta pesquisa foi desenvolvida em parceria com o projeto de Pós-Doutorado FAPESP 19/22532-0, intitulado “Biotransformação anaeróbia de micropoluentes orgânicos emergentes em sistema de tratamento de duplo estágio (acidogênico-metanogênico) tratando águas residuárias domésticas”, do pesquisador Dr. Rodrigo Braz Carneiro, sob coordenação do Prof. Dr. Alvaro José dos Santos Neto, ambos do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). Os reatores em questão foram operados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB-USP), com o enfoque na otimização da remoção de MPOs em ETEs, e a compreensão da contribuição de cada estágio do tratamento anaeróbio na redução desses xenobióticos, através do estabelecimento de um sistema de tratamento anaeróbio de duplo estágio.

As análises ecotoxicológicas foram realizadas utilizando invertebrados aquáticos cultivados no Laboratório de Ecologia em Ambientes Aquáticos (LEAA-USP), a partir de amostras de água residuária cedidas pelos pesquisadores citados anteriormente. No LEAA são desenvolvidas pesquisas nas áreas de ecotoxicologia aquática e ecologia de invertebrados aquáticos continentais, sob orientação e supervisão do Prof. Dr. Juliano José Corbi.

4.3 Esgoto doméstico sintético

Os reatores anaeróbios tiveram como substrato uma água residuária sintética (esgoto *lab-made*), simulando a fração solúvel do esgoto doméstico com demanda química de oxigênio (DQO) teórica de 1000 mg O₂/L, seguindo a metodologia de Lima Gomes et al., (2015). Este esgoto continha cerca de 50% de proteína, 40% de carboidratos e 10% de lipídeos (LIMA GOMES et al., 2015; CARNEIRO, 2019). Na etapa 2, foram acrescentados ao esgoto sintético 9 micropoluentes orgânicos na concentração de 50 µg/L cada, sendo 2 antibióticos (sulfametoxazol e ciprofloxacina), 3 anti-inflamatórios (ibuprofeno, naproxeno e diclofenaco), 2 parabenos (metilparabeno e propilparabeno) e 2 bloqueadores (metoprolol e carbamazepina). Os ensaios com os reatores anaeróbios de estágio único (metanogênico) e de duplo estágio (reator acidogênico seguido de reator metanogênico) ocorreram simultaneamente. Na figura 6 é possível observar um esquema de reator de leito fixo estruturado, que apresenta tiras verticais de espuma de poliuretano como material suporte.

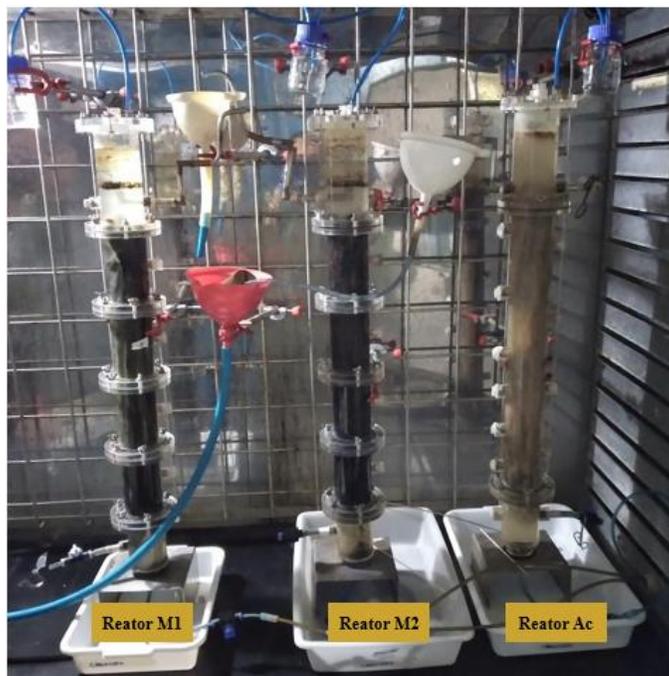
Figura 6 - Desenho esquemático de reator anaeróbico de leito fixo estruturado com fluxo ascendente



Fonte: Adaptado de CARNEIRO, 2019.

Os reatores de duplo estágio tiveram vazão de 0,33 L/h, com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 6 horas cada (reator Ac e M2), nas duas fases, com o efluente do reator acidogênico (Ac) alimentando o metanogênico (M2). O reator de estágio único teve vazão de 0,17 L/h, com TDH de 12 h, nas duas fases. Na figura 7, observa-se a distribuição dos reatores em escala de bancada, com alimentação contínua em fluxo ascendente.

Figura 7 – Disposição dos reatores anaeróbios em escala de bancada (da direita para a esquerda: Reator de dupla fase (Ac seguida do M2); Reator de fase única (M1))



Fonte: Autorial própria (2022).

4.4 Organismos – teste: cultivo e manutenção

Para as análises ecotoxicológicas foram utilizados 3 organismos-teste nativos de regiões subtropicais, sendo elas: o microcrustáceo filtrador *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera: Daphnidae), que é um organismo que apresenta sensibilidade à pequenas mudanças na qualidade da água e reprodução através da partenogênese, o que garante a estabilidade genética da população (NOVELLI, 2010; GROSSELI, 2016); *Pristina longiseta* (Oligochaeta: Naididae) e *Allonais inaequalis* (Oligochaeta: Naididae) que são espécies bentônicas, sendo adequada para análises ambientais devido a importância ecológica da sua classe, sensibilidade e facilidade de cultivo em laboratório (RODRIGUES et al., 2013; CORBI et al., 2015; CASTRO et al., 2020).

Os invertebrados *C. silvestrii* e *P. longiseta* foram cultivados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), na Escola de Engenharia de São Carlos – Campus 2, Universidade de São Paulo e suas condições e características operacionais de cultivo e manutenção são apresentadas na Tabela 10. O monitoramento dos cultivos foi realizado por meio da análise de

pH, condutividade elétrica e temperatura, utilizando uma sonda multiparâmetro (modelo AKLA32761). Já a dureza foi verificada através do dispositivo Visocolor® ECO.

Tabela 10 - Condições de cultivo mantidas no LEAA

	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	<i>Pristina longiseta</i>	<i>Allonais inaequalis</i>
Temperatura	25 ± 2°C	25 ± 2°C	25 ± 2°C
Fotoperíodo	12 h luz/12 h escuro	12 h luz/12 h escuro	12 h luz/12 h escuro
Composição do meio	Água reconstituída (NBR 12.713)	Água desclorada (Corbi et al. 2019)	Água desclorada (Corbi et al. 2019)
Sedimento	-	Areia fina muflada	Areia fina muflada
Aeração	-	Leve aeração	Leve aeração
Volume	1,5 L	500 mL	1 L
Alimentação	Aditivo alimentar e suspensão algácea	Ração macerada (Tetramin®)	Ração macerada (Tetramin®)
Troca do meio	3 vezes durante a semana	Quando volume de água estiver baixo	Quando volume da água estiver baixo
Método de cultivo	NBR 13373 (ABNT, 2017)	Castro et al. (2020b)	Corbi et al. (2015)

Fonte: Autoria própria (2022).

4.4.1 *Ceriodaphnia silvestrii*

O cultivo da espécie *C. silvestrii* foi realizado em béqueres de vidro de 2 litros, contendo 40 indivíduos em cada um deles, sendo mantida na sala de cultivos dos organismos nativos, com temperatura controlada em 25° ± 2°C e fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro, sem aeração. A troca de água e separação dos neonatos foi efetuada três vezes por semana, com o meio de cultivo sendo composto por água reconstituída, determinada pela norma NBR 13373 (ABNT, 2017), preparada semanalmente (Figura 8). As condições de dureza e pH da água também foram monitoradas, sendo mantidos na faixa de requisitos estipulados pela norma (dureza entre 40 e 48 mg CaCO₃/L; pH entre 7,0 e 7,6).

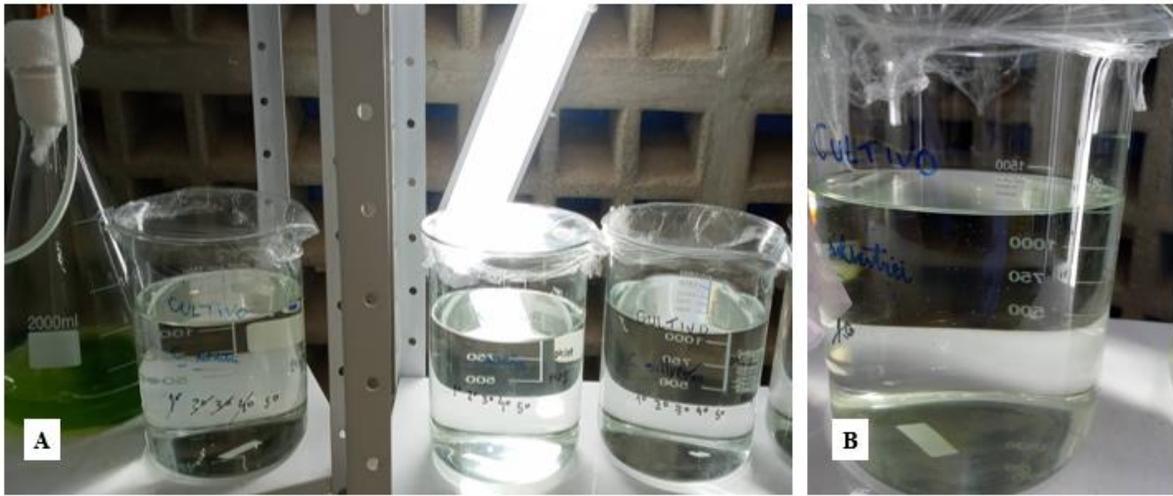
Figura 8 - Água reconstituída para cultivo de *C. silvestrii* (A: Soluções contendo os reagentes para preparo da água de cultivo; B: Armazenamento da água de cultivo)



Fonte: Autoria própria (2022).

A alimentação do microcrustáceo foi feita em conjunto com as trocas de água (três vezes por semana), sendo realizada através da aplicação da microalga *Raphidocelis subcapitata* (3×10^5 células/mL) e aditivo alimentar (1 mL/L). O aditivo foi constituído por 50 mL de solução fermentada (0,25 g de fermento biológico a cada 50 mL de água deionizada) e 50 mL de solução de ração de peixe (5 g de diluídos em um litro de água deionizada). Além disso, a cada troca de água também foi aplicada suplementação vitamínica para peixes Sera Fishtamin (cerca de 0,05 mL/L). Na Figura 9 é possível observar os béqueres de cultivo de *C. silvestrii*, assim como o cultivo da alga *R. subcapitata*.

Figura 9 - Cultivo de *C. silvestrii* (A: Béqueres contendo exemplares de *C. silvestrii* em diferentes gerações; e alga *R. subcapitata*; B: Exemplar de cultivo de *C. silvestrii*)

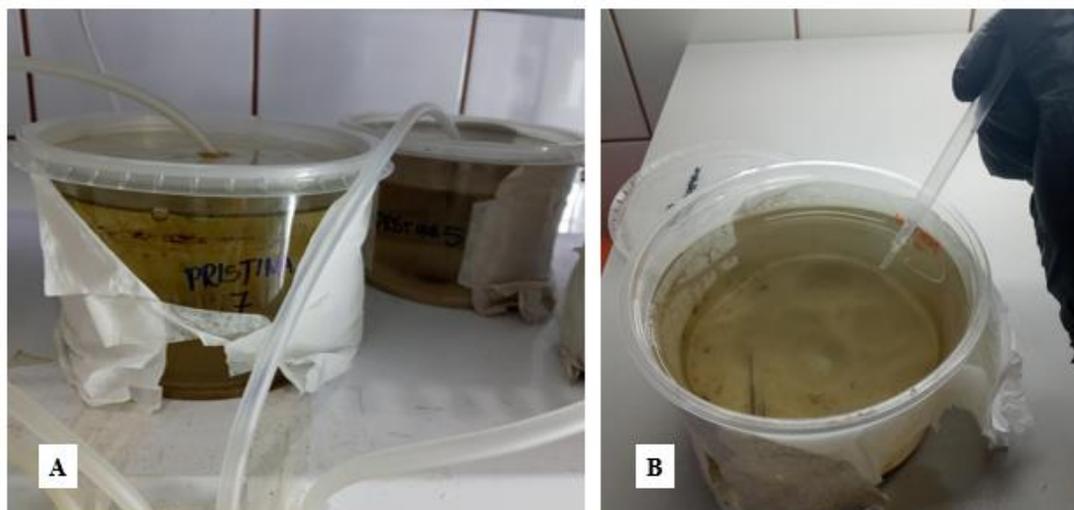


Fonte: Autoria própria (2022).

4.4.2 *Pristina longiseta* e *Allonais inaequalis*

O cultivo da espécie *P. longiseta* foi realizado em recipientes plásticos de 500 mL (11 cm de altura x 10 cm de diâmetro), preenchido com água desclorada filtrada, 100 g de areia fina esterilizada em mufla (550°C por 4 horas), e cerca de 20 indivíduos por 100 g de sedimento (CASTRO et al., 2020) (Figura 10). O cultivo de *A. inaequalis* foi realizado em caixas sifonadas de pvc redondas (38 cm de altura x 33 cm de diâmetro) em um volume de 1 L de água desclorada filtrada (Figura 11). Os Oligochaeta foram alimentadas uma vez por semana através da aplicação de 20 ± 1 mg de ração para peixe (Tetramin®) macerada, com a finalidade de diminuir o tamanho dos flocos e facilitar a ingestão, e leve aeração constante nas bandejas (cerca de 1 bolha por segundo). A manutenção dos cultivos foi realizada através do complemento da água desclorada evaporada do meio, ou quando o meio de cultivo apresentou elevada turbidez visual e presença de algas.

Figura 10 - Cultivo de *P. longiseta* (A: Recipientes plásticos contendo exemplares de *P. longiseta* conectado a um sistema de aeração; B: Exemplar de cultivo de *P. longiseta*)



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 11 - Cultivo de *A. inaequalis* (A: Recipientes contendo exemplares de *A. inaequalis* conectados a um sistema de aeração; B: Exemplar de cultivo de *A. inaequalis*)



Fonte: Autoria própria (2022).

4.5 Testes de Sensibilidade

Os testes de sensibilidade tiveram como objetivo avaliar e monitorar a qualidade e estabilidade dos cultivos mantidos em laboratório ao longo do tempo, através da criação de cartas-control. A periodicidade da realização dos testes foi em média a cada 6 meses, também levando

em consideração a disponibilidade de organismos e o planejamento de realização dos testes. Os ensaios de sensibilidade (ensaios de curta duração) foram realizados de acordo com as substâncias de referência indicadas nas suas respectivas metodologias (Tabela 11). As soluções de cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl) foram previamente preparadas, acondicionadas em frascos âmbar e armazenadas à 5°C no LEAA.

Tabela 11 - Características gerais e substância de referência para a realização dos testes de sensibilidade

Organismo	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	<i>Pristina longiseta</i>	<i>Allonais inaequalis</i>
Substância de Referência	NaCl	KCl	KCl
Metodologia	OECD (2008); ABNT, (2017)	Castro et al. (2020b)	Corbi et al. (2015); Felipe et al. (2020)
Número de organismos	5 neonatos com menos de 24 h de vida por réplica	6 por réplica	6 por réplica
Réplicas	3	3	3
Volume da solução-teste	30 mL	60 mL	60 mL
Duração	48 h	48 h	96 h
Resposta	Imobilidade	Mortalidade	Mortalidade

Fonte: Autoria própria (2022).

O monitoramento da saúde dos cultivos através da carta-controle possibilita avaliar a qualidade do meio e por consequência indicar situações de estresse. Além disso, é natural que ocorram variações na sensibilidade dos organismos sazonalmente e o estabelecimento dos limites médios superiores e inferiores das sensibilidades indicadas na carta-controle assegurará que só sejam utilizados para os testes ecotoxicológicos os cultivos que se adequem dentro dessas faixas estabelecidas.

4.6 Ensaio Ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados nas mesmas condições metodológicas de cultivo definidas anteriormente. Sendo monitorados os parâmetros pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica, antes e depois dos ensaios, com a finalidade de avaliar possíveis interferências ao longo dos testes. Os experimentos foram realizados a partir das amostras afluente (apenas etapa 2) e efluente (etapas 1 e 2) provenientes dos três reatores anaeróbios de leito fixo estruturado. As amostras da etapa 1 foram acondicionadas em galões plásticos de 5 L e congeladas por um período máximo de 30 dias até a realização total dos ensaios. Já as amostras da etapa 2 foram apenas refrigeradas para os ensaios de toxicidade aguda, e congeladas para realização dos ensaios crônicos. Todos os ensaios na etapa 2 foram realizados em 20 dias. Os ensaios da etapa 1 foram realizados entre agosto e setembro/2021, e os testes da etapa 2 foram realizados entre os meses de novembro e dezembro/2021. Na Figura 12 é possível observar o recipiente de armazenamento das amostras.

Figura 12 - Armazenamento das amostras (A: Recipiente plástico de 5 L; B: Refrigerador utilizado para armazenar as amostras)



Fonte: Autoria própria (2022).

4.6.1 Ensaios de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com a finalidade de avaliar o efeito agudo da exposição dos organismos às diferentes diluições do esgoto sintético. Os ensaios foram

preparados em béqueres de vidro (50 e 100 mL), sendo utilizados 5 neonatos de *C. silvestrii* (organismos com menos de 24 h de nascimento), 6 larvas de *P. longiseta* e de *A. inaequalis* (sem zona de fissão aparente), por réplica, em triplicata. Os ensaios com *C. silvestrii* e *P. longiseta* tiveram duração de 48h de exposição, já os ensaios com *A. inaequalis* tiveram 96h. Após a finalização do período de ensaio, as respostas foram avaliadas a partir da contagem de indivíduos nos béqueres com os Oligochaeta, e observação da imobilidade para os ensaios utilizando *C. silvestrii*. Os organismos foram suspensos através de pipetas descartáveis e adicionados um a um nas réplicas com as diluições, sem encostar na superfície da amostra para evitar contaminação. Além disso, também foram realizados ensaios com amostras controle (apenas água de cultivo), com a finalidade de averiguar diferenças significativas entre as diluições em uma condição favorável de sobrevivência. Na Tabela 12 é possível observar as características gerais dos ensaios de curta duração para as três espécies utilizadas na pesquisa.

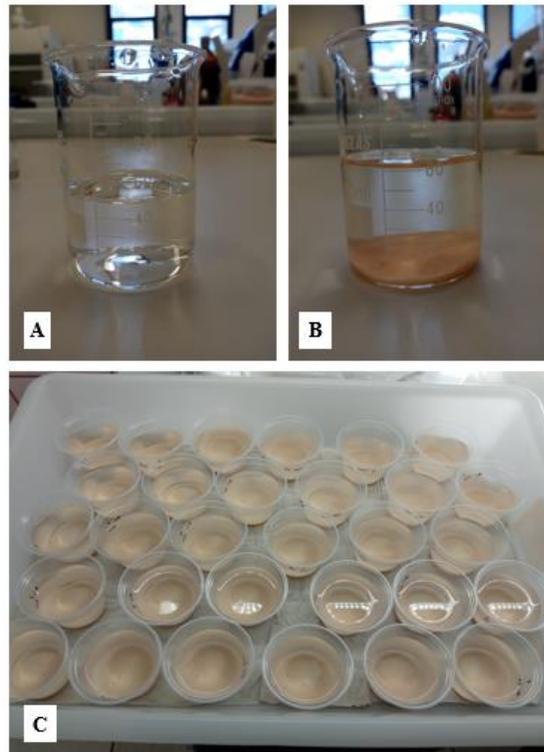
Tabela 12 - Características gerais para os testes de toxicidade aguda

Organismo	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	<i>Pristina longiseta</i>	<i>Allonais inaequalis</i>
Soluções-teste	Bruto e diluições (afluente e efluente)	Bruto e diluições (afluente e efluente)	Bruto e diluições (afluente e efluente)
Volume do frasco	Béquer 50 mL	Béquer 100 mL	Béquer 100 mL
Volume da solução	30 mL	60 mL	60 mL
Sedimento	-	10 g	10 g
Aeração	-	-	-
Alimentação	-	2 mg de TetraMin® no início	2 mg de TetraMin® no início
Réplicas	3	3	3
Duração	48h	48h	96h
Nº de organismos por réplica	5 neonatos com menos de 24 h de vida	6	6
Resposta	Imobilidade	Mortalidade	Mortalidade

Fonte: Autoria própria (2022).

As amostras foram preparadas conforme o método descrito na norma técnica NBR 13373 (ABNT, 2017) para a *C. silvestrii*; nas recomendações de Castro et al. (2020), para a *P. longiseta*; e recomendações de Corbi et al. (2015) para ensaios com *A. inaequalis*. Na etapa 1, foram realizados ensaios com as amostras (sem micropoluentes) tratadas provenientes dos três reatores, nas diluições 6; 12,5; 25 e 50% e 100%, conforme recomendado pelo manual de controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo (CETESB, 2013). Os ensaios nessa etapa foram realizados em recipientes plásticos, já que não haviam contaminantes que poderiam ser adsorvidos nos recipientes (Figura 13). As diluições foram elaboradas com a mesma água de cultivo de cada organismo. No caso dos Oligochaeta, as amostras foram preparadas utilizando água filtrada e desclorada. Já para o microcrustáceo, as diluições foram realizadas com água reconstituída.

Figura 13 - Ensaios de toxicidade aguda (A: Exemplo de réplica para ensaios agudos com *C. silvestrii*; B: Exemplo de réplica para ensaios agudos com *P. longiseta* e *A. inaequalis*; C: Ensaios realizados em recipientes plásticos)



Fonte: Autoria própria (2022).

4.6.2 Ensaio de toxicidade crônica

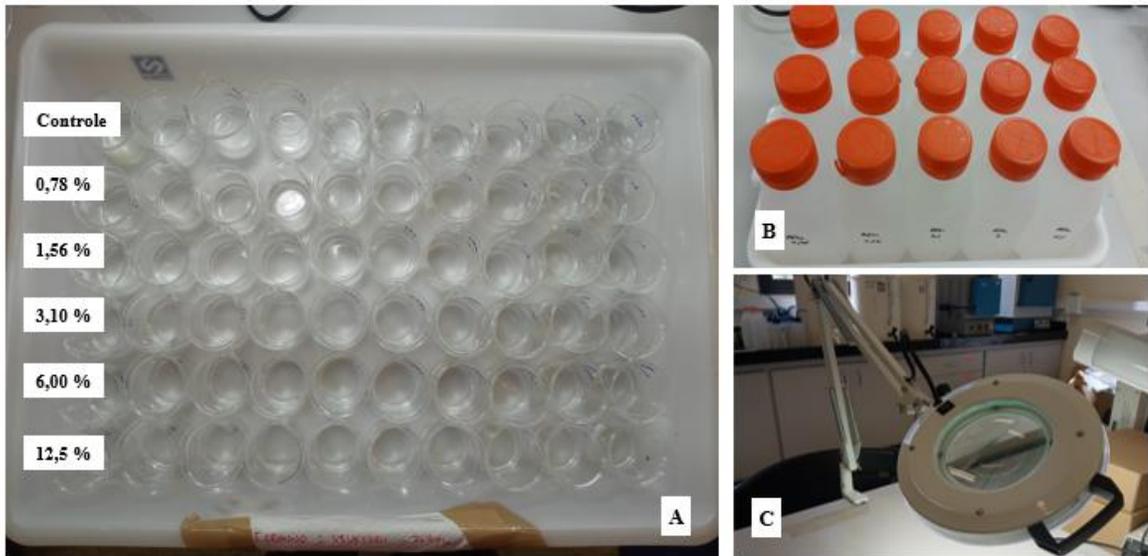
Nos ensaios de longa duração foi possível observar implicações na reprodução e sobrevivência (para *P. longiseta* e *A. inaequalis*), e imobilidade (para *C. silvestrii*).

- *Ceriodaphnia silvestrii*

Para os testes com *C. silvestrii*, foram utilizados béqueres de vidro (50 mL), contendo 1 neonato por réplica (organismos com menos de 24 h de nascimento), em 10 réplicas, sem aeração e com duração total de 7 dias. Após a finalização do período de ensaio, as respostas foram avaliadas a partir da contagem de indivíduos e observação da imobilidade. As diluições para os ensaios crônicos com *C. silvestrii* foram definidas a partir de ensaios prévios de reprodução, utilizando o mesmo fator de diluição dos ensaios de curta duração (fator 2). Sendo definidas em: 0,78; 1,56; 3,1; 6 e 12,5%. Seguindo a recomendação da NBR 13373, os ensaios de exposição crônica foram realizadas para as 5 diluições, em 10 réplicas, com 1 neonato por réplica (organismos com menos de 24 h de nascimento), com trocas do meio (diluições das amostras) no 3º e 5º dia, e alimentação no início e a cada troca.

As diluições para cada troca do meio foram preparadas no 1º dia de exposição, armazenadas e refrigeradas. A prole foi contabilizada a cada troca do meio e no fim do teste, assim como a verificação da imobilidade. Os resultados foram considerados válidos para os ensaios que tiveram menos de 20% de mortalidade (imobilidade) e número de reprodução mínima de 15 neonatos para cada réplica, em pelo menos 6 réplicas, nas amostras controle. Os neonatos foram contabilizados com o auxílio de uma lupa com lente de aumento (8x). Na Figura 14 é possível observar um dos ensaios de longa exposição em 10 réplicas para cada diluição, além das amostras armazenadas para troca do meio.

Figura 14 - Ensaio de toxicidade crônica com *C. silvestrii* (A: Amostras em 10 réplicas; B: Diluições armazenadas para as trocas do meio; C: Lupa de aumento (8x) para auxiliar na contabilização de neonatos)



Fonte: Autoria própria (2022).

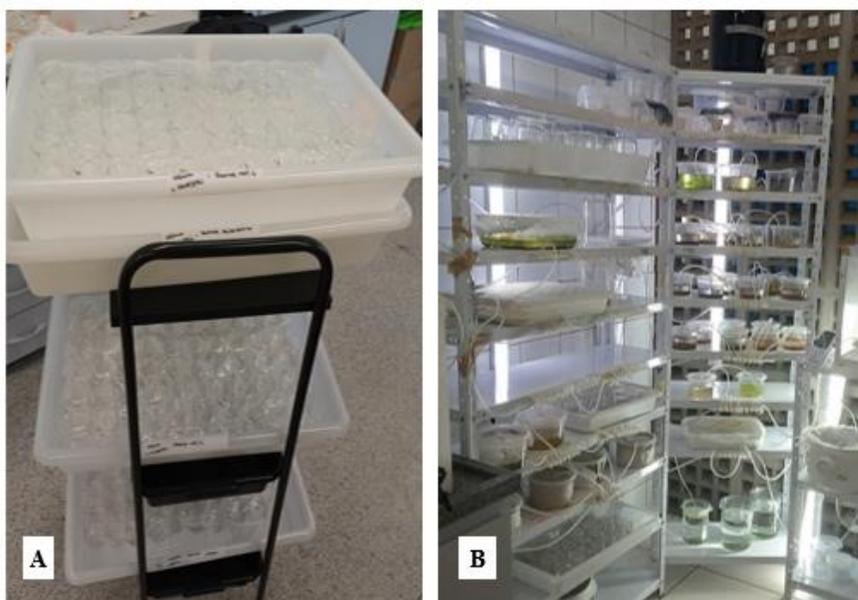
- *Pristina longiseta* e *Allonais inaequalis*

O método utilizado para realização dos ensaios de longa duração com *A. inaequalis* foi o sugerido por Felipe et al. (2020). Os ensaios foram realizados em béqueres de vidro de 100 mL, contendo 60 mL de solução teste, 6 organismos por réplica, em triplicata. As condições de aplicação do teste foram as mesmas dos ensaios de curta duração mencionados anteriormente. Os ensaios tiveram duração de 10 dias, com alimentação no 1º e 5º dia, sem aeração. As diluições dos ensaios foram definidas após os testes de exposição aguda, sendo definidas as mesmas concentrações destes ensaios, com o acréscimo de 1 diluição (75%), sendo elas: 6; 12,5; 25; 50 e 75%. Ao fim do período de exposição, os organismos foram contabilizados com o auxílio de pipetas plásticas descartáveis, com leve agitação do sedimento.

No caso da *P. longiseta*, ainda não existe um método publicado para os ensaios de exposição crônica (o artigo está em revisão em periódico), mas algumas condições de teste utilizadas foram semelhantes às de *A. inaequalis*. Tendo sido expostos 6 organismos, em 60 mL de solução teste, em béqueres de vidro de 100 mL, com aeração, período de 7 dias de exposição, alimentação apenas no início, e contabilização da prole no final do ensaio. Por ser um organismo

bentônico, *P. longiseta* demonstrou melhores resultados no controle quando o contato com a luz não ocorria de forma direta, então, para os ensaios foram utilizadas folhas de papel na superfície dos béqueres (sem impedir totalmente a luz), criando uma barreira a iluminação direta. As diluições das amostras foram de: 6; 12,5; 25; 50 e 75%. Na Figura 15 é possível observar as amostras preparadas e as prateleiras em que os testes foram armazenados.

Figura 15 - Ensaios de toxicidade crônica com *P. longiseta* e *A. inaequalis* (A: Ensaios realizados para 4 amostras; B: Estantes utilizadas para acomodação dos bioensaios)



Fonte: Autoria própria (2022).

Na Tabela 13 é possível observar um resumo com as características gerais dos ensaios de longa duração para os Oligochaeta aquáticos e o microcrustáceo.

Tabela 13 - Características gerais para os testes de toxicidade crônica

Organismo	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	<i>Pristina longiseta</i>	<i>Allonais inaequalis</i>
Soluções-teste	Bruto e diluições (afluente e efluente)	Bruto e diluições (afluente e efluente)	Bruto e diluições (afluente e efluente)
Volume do frasco	Béquer 50 mL	Béquer 100 mL	Béquer 100 mL

Tabela continua na próxima página

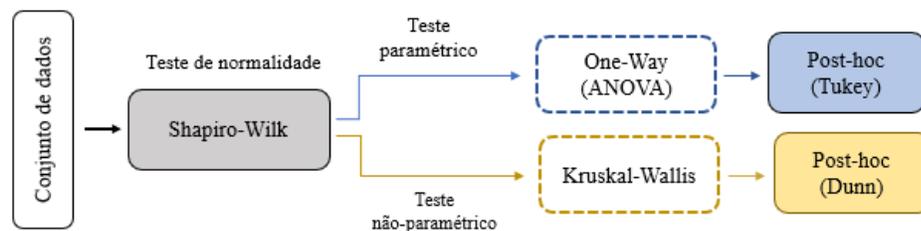
Organismo	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	<i>Pristina longiseta</i>	<i>Allonais inaequalis</i>
Volume da solução	15 mL	60 mL	60 mL
Sedimento	-	10 g	10 g
Aeração	-	-	-
Alimentação	No 1º, 3º e 5º dia – alga e aditivo alimentar	2 mg de TetraMin® no 1º dia	2 mg de TetraMin® no 1º e no 5º dia
Réplicas	10	3	3
Duração (dias)	7 d	7 d	10 d
Nº de organismos por réplica	1 neonato com menos de 24 h de vida	6	6
Resposta	Reprodução e imobilidade	Reprodução e sobrevivência	Reprodução e sobrevivência

Fonte: Autoria própria (2022).

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas tiveram como finalidade averiguar se houve similaridade estatística entre os conjuntos de dados para as amostras brutas, diluições e os controles (água de cultivo de cada organismo). Além disso, também foi averiguado se houberam diferenças significativas entre os resultados dos reatores para as etapas 1 (sem MPOs) e etapa 2 (com MPOs). Dessa forma, foi possível avaliar em que diluições o lançamento do esgoto (contendo MPOs) tratado por reatores anaeróbios não representaria impactos ecotoxicológicos (estatisticamente) para a biota aquática. Na Figura 16, é possível observar o fluxograma da análise estatística realizada para os diferentes conjuntos de dados.

Figura 16 - Fluxograma das etapas na análise estatística dos dados



Fonte: Autoria própria (2022).

Para definir o método estatístico a ser utilizado, foi necessário compreender a natureza da distribuição do conjunto de dados. Para isso, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, no *software* Past® (Paleontological Statistics) versão 3.2.1, a fim de averiguar se a distribuição dos dados era normal ou não normal. Para os dados que apresentaram distribuição normal ($p \geq 0,05$), os resultados foram tratados em testes de hipótese paramétricos, caso contrário, os testes de hipótese utilizados foram os não-paramétricos. Nesse contexto, o teste paramétrico de One-Way ANOVA foi utilizado afim de verificar se houveram diferenças estatísticas significativas entre os conjuntos de dados, com distribuição normal. Em seguida foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey para averiguar as diferenças significativas entre cada diluição e controle.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado nos grupos de dados que não apresentaram distribuição normal ($p \leq 0,05$). Esse teste também tem como objetivo averiguar se houveram diferenças estatísticas entre os diferentes conjuntos de dados. Já o *post-hoc* de Dunn foi utilizado para verificar as diferenças significativas entre as diferentes diluições e controle, para amostras com distribuição não-normal.

Além disso, também foram analisadas as diferenças significativas entre os diferentes reatores, com a finalidade de compreender se havia semelhança entre os resultados apresentados em cada diluição. Essas análises também foram realizadas utilizando o *software* Past® versão 3.2.1, por meio da análise de variância com dois fatores (Two-Way ANOVA).

4.8 Expressão dos Resultados

- Concentração mediana letal (CL) e Concentração mediana de efeito (CE)

Utilizando o *software* R versão 3.5.0 (pacotes MASS e DRC) foram identificadas as diluições das amostras (afluente e efluente) em que se observam a concentração letal mediana (CL_x) em 10 e 50% dos organismos, para as amostras com *P. longiseta* e *A. inaequalis*. Já para os ensaios com *C. silvestrii*, foram observados as concentrações médias que causaram efeito agudo de imobilidade (CE_x) em 10 e 50% dos organismos. Os resultados observados nos ensaios de toxicidade crônica foram expressos na forma de concentração de efeito inibitório de reprodução CE_x (10 e 50%) para os três organismos utilizados na pesquisa.

Os resultados obtidos para os testes de toxicidade de exposição aguda e crônica na forma de CL_x e CE_x indicam uma relação inversamente proporcional à toxicidade do efluente estudado, ou seja, quanto maior a concentração necessária para causar efeito de imobilidade, letalidade e inibição da reprodução, menor é a toxicidade identificada na água residuária (COSTA et al., 2008).

- CENO e CEO

Com as respostas obtidas na etapa das análises estatísticas (com o uso do *software* Past® versão 3.2.1), foram identificadas as diluições em que se observaram diferenças significativas aos resultados do controle. Nesse caso, a Concentração de Efeito Não Observado (CENO), diz respeito a maior concentração em que não houveram diferenças significativas detectadas, nos testes de hipótese. Nesse caso, o CENO indica a maior concentração em que não foi observado estatisticamente efeito tóxico. Já a Concentração de Efeito Observado (CEO), diz respeito à menor concentração em que houveram diferenças significativas detectadas em comparação as amostras controle. Ou seja, a primeira concentração em que foi observado estatisticamente, efeito tóxico para os organismos. O CENO e CEO foram definidos apenas para os ensaios crônicos.

- Gráficos

Os gráficos foram elaborados com o auxílio dos *softwares* Origin (Pro), versão 2019, da OriginLab Corporation, e também do Microsoft Excel, versão 2020.

- Redução da toxicidade

A redução da toxicidade foi calculada apenas para etapa 2 (amostras contendo MPOs). O cálculo foi realizado por meio de regra de três simples, utilizando as respostas dos ensaios com as amostras afluente e efluente (toxicidade aguda e crônica), segundo a equação abaixo.

$$\text{Redução da toxicidade (\%)} = 100 - \left(\frac{CE_{50}(\text{afluente}) \times 100}{CE_{50}(\text{efluente})} \right)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

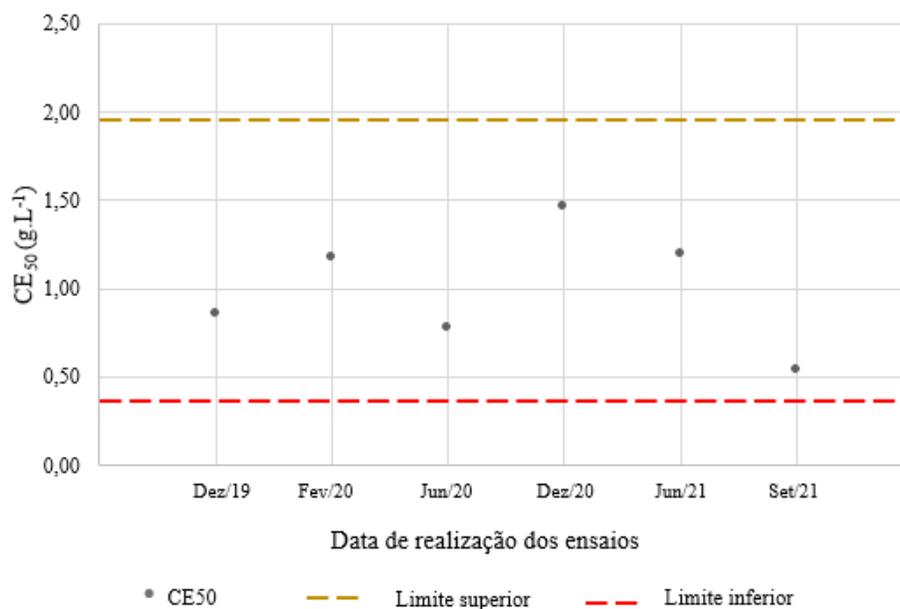
5.1 Testes de sensibilidade

A elaboração da carta controle teve como objetivo acompanhar o desenvolvimento das culturas em laboratório, avaliando sua sensibilidade ao longo do tempo, através de exposições agudas (CL50 ou CE50) utilizando substâncias de referência.

- *Ceriodaphnia silvestrii*

Para *C. silvestrii* os resultados obtidos para as exposições com cloreto de sódio (NaCl) ficaram entre 0,5 e 1,33 g/L, com um valor médio de 1,02 g/L, e nenhuma das respostas ultrapassaram os limites máximos e mínimos estabelecidos na carta controle (Figura 17). Os ensaios foram realizados entre 2019 e 2021.

Figura 17 – Ensaio de sensibilidade com *Ceriodaphnia silvestrii* (48h)



Fonte: Autoria própria (2022).

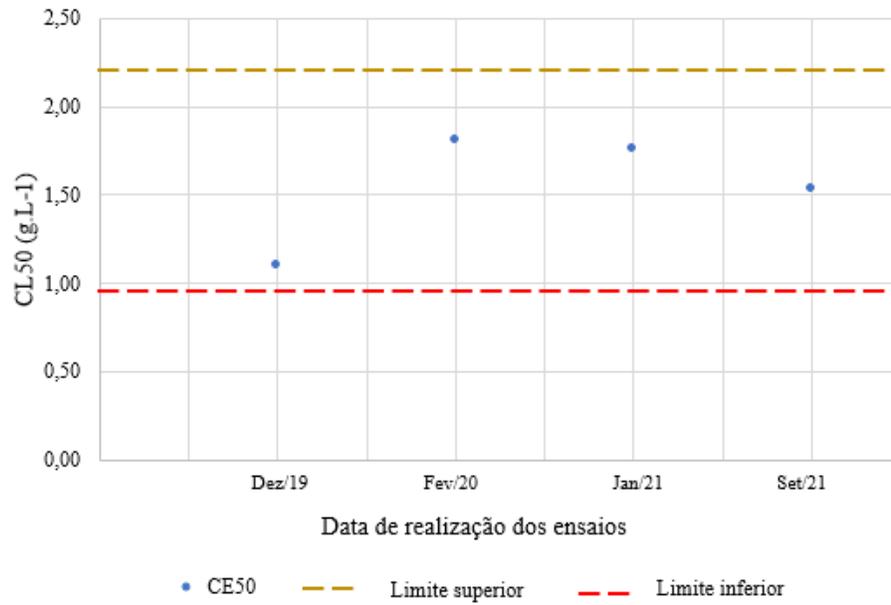
Como não houveram variações para além dos limites máximos e mínimos, ficando inclusive a maioria dos pontos próximos ao valor médio, as respostas para sensibilidade indicam controle estatístico do processo (SMETI et al. 2007). Além disso, as condições observadas de dureza e pH seguiram as faixas recomendadas pela ABNT (2017). Os resultados obtidos na carta controle (média de 1,02 g/L) foram semelhantes aos valores observados por outros autores, que ficaram em média entre 0,9 – 1,7 g/L para CE₅₀ de NaCl em exposições agudas (SPADOTO et al., 2017; MANSANO et al., 2018; MASSANO et al., 2020; LEITE et al., 2022). Nesse caso, considerando as condições de sensibilidade, os organismos foram classificados como aptos para realização dos ensaios com os MPOs.

- *Pristina longiseta* e *Allonais inaequalis*

Os ensaios de sensibilidade com os Oligochaeta foram realizados em exposições com cloreto de potássio (KCl), seguindo recomendações de Corbi et al. (2015) e Castro et al. (2020b). Os ensaios com *P. longiseta* tiveram uma concentração letal (CL₅₀) de 1,65 g/L, próximas a concentrações letais observadas por Castro et al. (2020b) (CL₅₀ de 1,76 g/L) e Pinheiro (2021) (CL₅₀ de 1,32 g/L). Por se tratar de uma espécie com cultivo relativamente recente no LEAA, o gráfico de sensibilidade dispõe apenas de 4 pontos, mas todos eles dentro dos limites máximos e mínimos estabelecidos na carta controle (Figura 18).

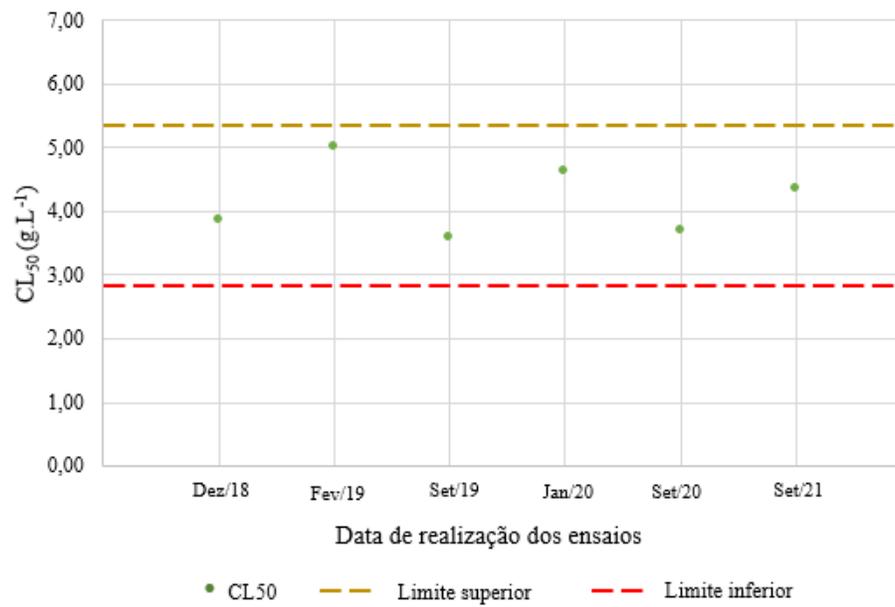
Os ensaios com *A. inaequalis* tiveram como resposta uma concentração letal média (CL₅₀) de 4,12 g/L (Figura 19), próximo a valores identificados por Corbi et al. (2015) (CL₅₀ de 3,50 g/L), Castro et al. (2021b) (CL₅₀ de 3,70 g/L) e Pinheiro, 2021 (CL₅₀ de 4,46 g/L). Nesse caso, a espécie também se enquadrou dentro da faixa de limites superiores e inferiores da carta controle, estando apta para realização dos bioensaios. Quando comparados os resultados para as duas espécies de Oligochaeta, foi possível observar que a *P. longiseta* apresentou maior sensibilidade letal à substância de referência (KCl), o que pode ser um indicativo de que essa espécie seja mais sensível a outros contaminantes inorgânicos que *A. inaequalis*.

Figura 18 - Ensaio de sensibilidade com *Pristina longiseta* (48h)



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 19 - Ensaio de sensibilidade com *Allonais inaequalis* (96h)



Fonte: Autoria própria (2022).

5.2 Caracterização das amostras

5.2.1 Etapa 1 – Esgoto sintético sem MPOs

- Eficiência dos reatores na redução da carga orgânica

Os resultados do monitoramento dos reatores foram cedidos pelo pesquisador Rodrigo Braz Carneiro, sendo referentes ao período de realização dos ensaios ecotoxicológicos (entre setembro e dezembro de 2021). Nesse contexto, os reatores apresentaram elevada eficiência na redução da DQO e carboidratos. O reator de fase única (M1), apresentou 86% de redução da DQO, já o sistema de dupla-fase indicou redução de 92% ao final da etapa metanogênica (M2). É importante ressaltar, que ambos os tratamentos apresentaram elevada remoção dos carboidratos (100% para reator de fase única e 99% para reatores de fase dupla). Na Tabela 14, é possível identificar os parâmetros de interesse, monitorados durante o período de operação dos reatores na etapa 1.

Tabela 14 - Resultados de monitoramento do sistema durante a etapa 1 – sem adição de MPOs

Parâmetro (unidade)	Sistema fase única		Sistema fase dupla	
	M ₁	Ac	M ₂	
DQO afluente (mg O ₂ /L)	1013	1017	661	
DQO efluente (mg O ₂ /L)	135	661	77	
DQO remoção (%)	86	35	92	
Carboidratos afluente (mg/L)	838	803	41	
Carboidratos efluente (mg/L)	4	41	5	
Carboidratos remoção (%)	100	95	99	
pH afluente	7,73	6,83	5,73	
pH efluente	7,35	5,73	7,40	
Alcalinidade total afluente (mg-CaCO ₃ /L)	327	44	195	
Alcalinidade total efluente (mg-CaCO ₃ /L)	500	195	337	

Fonte: Autoria própria (2022).

O pH das amostras do reator de fase única (M1) se manteve estável (pH básico), sem grandes variações (7,73 a 7,35). Já na etapa acidogênica (Ac), com os reatores de duplo estágio, as amostras apresentaram decaimento do pH (5,73), em função da etapa acidogênica do tratamento anaeróbio, em que ocorre a formação e acúmulo de ácidos (principalmente ácidos carboxílicos de cadeia curta), voltando o pH a faixa básica após a fase metanogênica no reator M2 (7,40) (KHALID et al., 2011; SILVA et al., 2020). A alcalinidade, que é um indicativo da capacidade do meio de resistir a alterações no pH (capacidade tampão), sendo formado principalmente por carbonatos (CO_3^{2-}), bicarbonatos (HCO_3^-) e hidróxidos (OH^-), apresentaram aumento em todos os estágios de tratamento anaeróbio (VON SPERLING, 2018). Na digestão anaeróbia, a produção de alcalinidade é um indicativo positivo durante o monitoramento dos reatores, já que evidencia a capacidade de tamponamento da água residuária (CARNEIRO, 2019).

A alcalinidade não é um parâmetro de interesse quando analisamos o lançamento de esgoto tratado em corpos receptores, já que ela não possui impacto direto no corpo hídrico. Entretanto, a alcalinidade está diretamente relacionada à dureza (carbonato), que é um parâmetro de interesse ecotoxicológico (BOYD, 2015; VON SPERLING, 2018). Alguns autores pontuam a dureza como um agente interferente na observação da toxicidade em organismos aquáticos expostos à contaminantes químicos. Nesse contexto, águas mais duras tendem a reduzir o efeito tóxico dos contaminantes, embora essa relação ainda não seja totalmente compreendida. Rathore e Khangarot (2002), observaram em ensaios de toxicidade aguda com o Tubicidae *Tubifex tubifex*, expostos a diferentes metais (cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), chumbo (Pb), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn)), que em águas duras e muito duras (até 300 mg CaCO_3/L) o efeito tóxico letal observado foi menor para todos os metais apontados anteriormente, em função do aumento da dureza da água.

A influência da dureza na toxicidade em organismos aquáticos também foi observada por Oliveira-Filho et al. (2014), em ensaios com águas naturais contendo diferentes graus de dureza, em exposições de toxicidade crônica com o molusco *Biomphalaria glabrata*. Os autores apontaram que águas mais duras (até 120 mg CaCO_3/L) houveram efeitos de indução da geração de ovos (em média 550 ovos por molusco), em comparação com águas moles (até 10 mg CaCO_3/L) (em média 250 ovos por molusco). Evidenciando, que mesmo em amostras naturais, a dureza interfere na

toxicidade de espécimes aquáticos. Porém, levando em consideração que águas muito duras já não apresentam tanta discrepância em sua influência na toxicidade (acima de 300 mg CaCO₃/L).

- Parâmetros monitorados durante os ensaios ecotoxicológicos

As análises dos parâmetros antes e após a finalização dos bioensaios para as exposições agudas tiveram pouca variação entre o primeiro e último dia de teste. Todos os resultados para as amostras controle (apenas com água de cultivo) se mantiveram dentro da faixa de pH (entre 5 a 9) e oxigênio dissolvido (acima de 3 mg/L) indicados pela NBR13373 (ABNT, 2017), para que não haja interferências nos resultados dos ensaios. Para as análises com o esgoto sintético efluente aos reatores, alguns resultados do oxigênio dissolvido (OD) apresentaram valores próximos a 3 mg/L, como o caso do reator metanogênico M1 (fase única), que para as maiores diluições esses valores foram até 3,4 para os ensaios com *C. silvestrii*, *P. longiseta* e *A. inaequalis*. Na Tabela 15, estão indicadas as faixas de valores obtidos após a finalização dos ensaios de toxicidade aguda (valores máximos e mínimos), para as amostras dos três reatores e controles (apenas água de cultivo).

Tabela 15 – Resumo das características das amostras nos ensaios de exposição aguda

Organismo-teste	Parâmetro	Controle	Sistema fase única	Sistema fase dupla	
			M ₁	Ac	M ₂
<i>C. silvestrii</i>	pH	6,4 - 6,2	8,0 - 7,9	7,8 - 6,6	8,3 - 8,0
	Condutividade (µs/cm)	163 - 165	236 - 1735	225 - 1341	222 - 1308
	OD (mg O ₂ /L)	6,4 - 6,2	5,9 - 3,5	5,9 - 4,7	5,4 - 4,2
<i>P. longiseta</i>	pH	7,4 - 7,3	7,6 - 8,3	8,1 - 7,3	8,0 - 8,3
	Condutividade (µs/cm)	41,2 - 40,3	44 - 1694	123 - 1304	210 - 1287
	OD (mg O ₂ /L)	6,3 - 5,4	5,0 - 3,4	4,8 - 4,2	6,4 - 6,1
<i>A. inaequalis</i>	pH	7,4 - 7,3	7,6 - 8,3	8,1 - 7,3	8,0 - 8,3
	Condutividade (µs/cm)	41,2 - 40,3	41 - 1694	123 - 1306	222 - 1308
	OD (mg O ₂ /L)	5,9 - 5,1	4,8 - 3,7	4,9 - 4,4	6,2 - 6,4

Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

Fonte: Autoria própria (2022).

Com relação a condutividade elétrica, que é uma medida indireta para avaliar sais dissolvidos em amostras aquosas, indicando com isso em esgotos sanitários, a concentração de carga orgânica dissolvida nas amostras (CETESB, 2008). Os ensaios com as amostras do reator de fase dupla (Ac e M2) tiveram os menores valores de condutividade nas amostras brutas (100%), seguidos do reator de fase única (M1) para as três espécies estudadas, com valores variando entre 41 a 1694 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (dados na íntegra no APENDICE A).

Para os ensaios de toxicidade crônica, as faixas de pH e OD dos ensaios também ficaram dentro da faixa estabelecida pela ABNT (2017). Apenas em amostras do reator acidogênico (Ac) (fase dupla) os valores de pH ficaram próximos aos valores mínimos recomendados pela norma, com pH em 5,4 nos maiores percentuais de diluição para os ensaios com os organismos bentônicos. Os menores valores de oxigênio dissolvido foram identificados nos ensaios com *A. inaequalis*, 3,1 (mg O₂/L) para as amostras do reator metanogênico (dupla fase). Podendo ter relação com o período de duração do teste, que é de 10 dias, sem oxigenação mecânica. Na Tabela 16, segue um resumo dos parâmetros para os ensaios de longa duração, com uma faixa entre os resultados obtidos no último dia de teste (valores máximos e mínimos).

Tabela 16 - Resumo das características das amostras nos ensaios de toxicidade crônica

Organismo-teste	Parâmetro	Controle	Sistema fase única	Sistema fase dupla	
			M ₁	Ac	M ₂
<i>C. silvestrii</i>	pH	6,28 - 6,11	7,6 - 6,9	7,2 - 6,8	7,8 - 6,4
	Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	158 - 154	178 - 345	165 - 180	177 - 252
	OD (mg O ₂ /L)	6,28 - 6,11	6,9 - 6,1	6,3 - 6,9	6,3 - 6,2
<i>P. longiseta</i>	pH	7,5 - 7,1	8,2 - 8,8	7,0 - 5,4	7,6 - 7,8
	Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	41 - 39	134 - 1658	110 - 1344	161 - 1308
	OD (mg O ₂ /L)	6,1 - 5,0	5,4 - 3,4	5,1 - 3,5	5,1 - 3,8
<i>A. inaequalis</i>	pH	7,5 - 7,1	8,2 - 8,8	7,0 - 5,4	7,6 - 7,8
	Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	41 - 39	134 - 1702	110 - 1344	161 - 1302
	OD (mg O ₂ /L)	6,1 - 5,0	5,1 - 3,1	5,0 - 3,3	5,1 - 3,5

Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

Fonte: Autoria própria (2022).

5.2.2 Etapa 2 – Esgoto sintético contendo MPOs

Na etapa contendo os MPOs, os reatores também apresentaram elevada eficiência na redução da DQO e carboidratos. O reator de fase única (M1), apresentou 95% de redução da DQO, já o sistema de dupla-fase indicou redução de 94% ao final da etapa metanogênica (M2). Já a remoção de carboidratos foi de 99,5% (reator M1), 94,3% (reator Ac) e 98,7% (reator M2). Também não houveram drásticas variações do pH, ficando acima de 7,3 ao fim das etapas metanogênicas, e 5,76 após o reator acidogênico (dupla fase). Além disso, também houve produção da alcalinidade em todas as fases do tratamento anaeróbio, assim como na etapa 1. Na Tabela 17, é possível observar os parâmetros monitorados durante a operação dos reatores na etapa 2 (contendo MPOs).

Tabela 17 - Resultados de monitoramento do sistema durante a etapa 2 – com adição dos MPOs

Parâmetro (unidade)	Sistema fase única		Sistema fase dupla	
	M ₁	Ac	M ₂	
DQO afluente (mg O ₂ /L)	1225	1202	618	
DQO efluente (mg O ₂ /L)	47	618	59	
DQO remoção (%)	95	36	94	
Carboidratos afluente (mg/L)	779	678	9	
Carboidratos efluente (mg/L)	4	9	5	
Carboidratos remoção (%)	99,5	94,3	98,7	
pH afluente	7,90	6,76	5,76	
pH efluente	7,33	5,76	7,44	
Alcalinidade total afluente (mg-CaCO ₃ /L)	382	39	108	
Alcalinidade total efluente (mg-CaCO ₃ /L)	549	108	281	

Fonte: Autoria própria (2022).

Com relação a eficiência dos reatores na remoção dos compostos emergentes (MPOs), para fins de comparação com os resultados ecotoxicológicos, não foi possível sua quantificação em tempo hábil, por conta da indisponibilidade do espectrofotômetro de massas, que estava em manutenção. Sendo resguardados os seus resultados (quando houver disponibilidade do equipamento) para fins de discussão e posterior complementação desta pesquisa em publicações futuras.

- Parâmetros monitorados durante os bioensaios

Para as amostras da etapa 2, nos bioensaios de toxicidade aguda, os parâmetros pH e OD ficaram dentro da faixa indicada pela norma (Tabela 18) (valores na íntegra no APENDICE B). Os valores de condutividade elétrica identificados na etapa 2 foram mais baixos que os detectados na fase 1, podendo nesse caso, haver relação com a eficiência dos reatores na redução dos compostos orgânicos dissolvidos. Embora as amostras tenham sido congeladas tanto na etapa 1 quanto na etapa 2, ambas seguiram recomendações da NBR15469 (ABNT, 2021), que trata da coleta e acondicionamento de amostras para realização de ensaios ecotoxicológicos. Nesse caso, a norma indica que amostras de efluentes podem ser congeladas por até 60 dias abaixo de 10°C (até 36h após a coleta). Além disso, estudos apontam não haver divergências nos resultados obtidos para ensaios com amostras aquosas congeladas e refrigeradas. Libralato et al. (2009), por exemplo, em ensaios com embriões da ostra *Crassostrea gigas*, observaram que a toxicidade letal para ensaios com amostras descongeladas (30 dias a -18 ± 1 °C) e refrigeradas (3 dias em 4 ± 1 °C) não apresentaram diferenças significativas para exposições com esgoto doméstico.

Tabela 18 - Resumo das características das amostras (contendo MPOs) nos ensaios de toxicidade aguda

Organismo-teste	Parâmetro	Controle	Afluente	Sistema fase única	Sistema fase dupla	
				M ₁	Ac	M ₂
<i>C. silvestrii</i>	pH	7,12 - 7,24	7,24 - 7,41	7,84 - 8,19	7,19 - 6,61	7,98 - 8,48
	Condutividade (µs/cm)	148 - 149	200 - 898	206 - 709	180 - 788	175 - 729
	OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-
<i>P. longiseta</i>	pH	7,28 - 7,14	7,04 - 7,66	7,1 - 7,3	7,54 - 7,59	7,57 - 7,88
	Condutividade (µs/cm)	58,60 - 60,1	138 - 1185	132 - 895	105 - 784	102 - 990
	OD (mg O ₂ /L)	7,28 - 6,11	6,3 - 4,04	6,14 - 5,1	6,5 - 3,98	6,6 - 3,47
<i>A. inaequalis</i>	pH	7,35 - 7,16	7,04 - 7,82	7,1 - 7,9	7,54 - 7,68	7,57 - 8,14
	Condutividade (µs/cm)	55,6 - 55,0	143 - 1189	139,4 - 922,4	105 - 784	104 - 997
	OD (mg O ₂ /L)	7,24 - 6,21	6,20 - 3,88	6,34 - 4,88	6,88 - 3,31	6,35 - 3,16

Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

Sem o equipamento de medição do OD no período de realização dos ensaios com *C. silvestrii*

Fonte: Autoria própria (2022).

Para os ensaios de toxicidade crônica (Tabela 19), foram verificados valores de OD abaixo de 3 mg/L ao final da exposição de 10 dias para o *A. inaequalis* (reator Ac), ficando abaixo do recomendado pela norma. Por outro lado, alguns autores indicam que a classe Oligochaeta é tolerante a condições de baixa oxigenação, ou até mesmo sobrevive em ambientes anóxicos (CHAPMAN et al., 1982; MATTSON et al., 2008). Alves et al. (2006), ao caracterizar a fauna da classe Oligochaeta em córregos urbanos no estado de São Paulo, constataram que a riqueza de espécies da classe foi significativamente maior nos ambientes com alta condutividade (até 183,3 µs/cm) e baixa concentração de OD (entre 1,32 e 3,71 mg/L), em comparação com os ambientes com baixo enriquecimento orgânico. Nesse caso, a baixa concentração de OD não teria efeito negativo nos bioensaios ecotoxicológicos com *A. inaequalis*. Todos os outros parâmetros avaliados se mantiveram dentro da faixa observada na etapa 1.

Tabela 19 - Resumo das características das amostras (contendo MPOs) nos ensaios de toxicidade crônica

Organismo-teste	Parâmetro	Controle	Afluente	Sistema fase única	Sistema fase dupla	
				M ₁	Ac	M ₂
<i>C. silvestrii</i>	pH	7,85 - 7,81	7,14 - 7,77	5,8 - 8,0	8,0 - 5,47	7,84 - 6,79
	Condutividade (µs/cm)	155 - 155	155 - 281	110 - 290	175 - 224	171 - 232
	OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-
<i>P. longiseta</i>	pH	7,28 - 6,95	8,12 - 8,29	6,93 - 7,24	7,28 - 7,08	6,95 - 7,8
	Condutividade (µs/cm)	58,60 - 56,70	196 - 1243	171 - 920	163 - 784	151 - 985
	OD (mg O ₂ /L)	7,18 - 6,60	6,11 - 3,98	5,90 - 3,46	6,22 - 3,45	5,97 - 3,21
<i>A. inaequalis</i>	pH	7,28 - 6,95	8,12 - 8,29	6,93 - 7,24	7,28 - 7,08	6,95 - 7,8
	Condutividade (µs/cm)	55,60 - 49,70	196 - 1249	173 - 924	163 - 789	151 - 997
	OD (mg O ₂ /L)	7,24 - 6,30	5,60 - 3,79	5,98 - 3,32	5,98 - 2,98	6,12 - 3,18

Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

Sem o equipamento de medição do OD no período de realização dos ensaios com *C. silvestrii*

Fonte: A autoria própria (2022).

5.3 Ensaios de toxicidade aguda

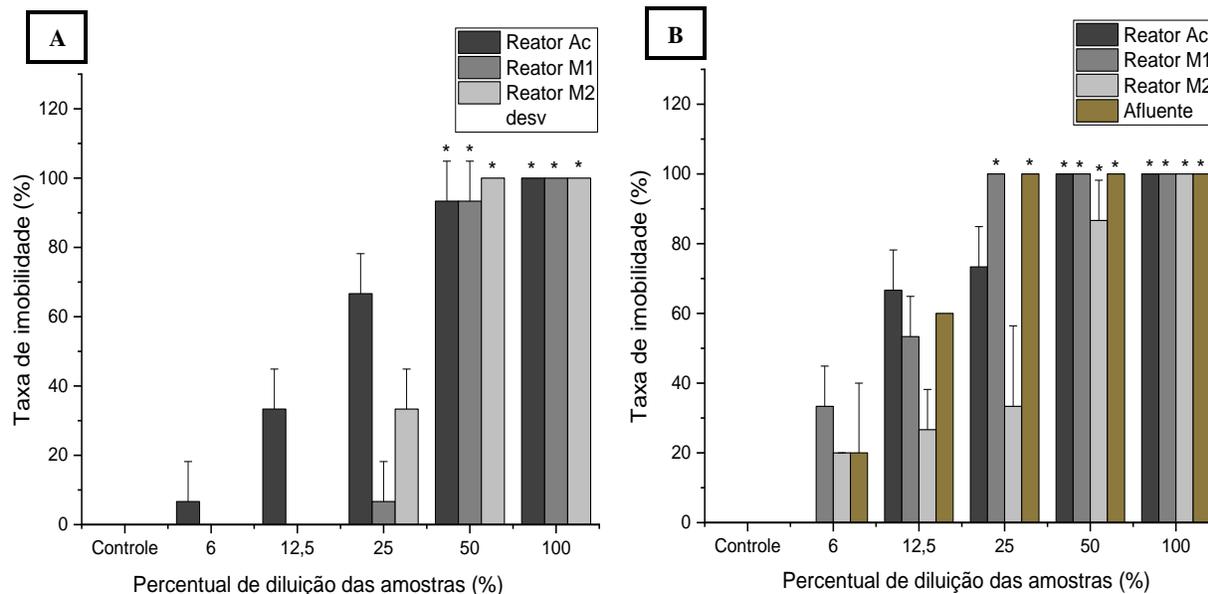
Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda da etapa 1, foram utilizados para compreender o desempenho dos reatores com relação à toxicidade das amostras de esgoto sintético sem MPOs, além de avaliar o impacto da carga orgânica e micronutrientes na taxa de mortalidade. Com isso, foi possível observar se o comportamento dos reatores permaneceu semelhante na redução da toxicidade quando comparados com as amostras contendo os MPOs (etapa 2).

5.3.1 *Ceriodaphnia silvestrii*

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda com a ausência e presença de MPOs indicaram elevada taxa de imobilidade da espécie de *C. silvestrii* nas diluições 50 e 100%, (Figura 20). Além disso, para as amostras do esgoto sintético contendo os MPOs (Figura 20b) foi possível constatar que o afluente aos reatores apresentou elevada toxicidade letal a partir da concentração

12,5%, enquanto que nas amostras tratadas (da mesma etapa) o elevado efeito de imobilidade foi constatado nas diluições acima de 25%.

Figura 20 - Ensaio de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii* (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)



Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

*Indicam diferenças estatísticas significativas entre a diluição e a amostra controle

Fonte: Autoria própria (2022).

Todos os resultados para as exposições de curta duração tiveram distribuição não-normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$), o que em ensaios ecotoxicológicos é comum, já que geralmente as suas variâncias não são homogêneas (WANG; RIFFEL, 2011; SZÖCS; SCHÄFER, 2015). Além disso, o conjunto de dados para os ensaios de toxicidade aguda nesta pesquisa (5 diluições em triplicata) é considerado “pequeno” para utilização de testes de hipótese paramétricos, sendo ideal nesse caso, um volume de dados superior a 20, para que de fato se caracterizem distribuições mais homogêneas (distribuição de dados normais) (ISLAM, 2018).

Nesse contexto, o ideal é utilizar testes de hipótese não paramétricos. Assim, foram identificadas diferenças significativas entre a imobilidade detectada nas amostras controle e as diferentes diluições das amostras de esgoto afluenta e efluente ($p \leq 0,05$), segundo o teste de

hipótese não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em sequência, o teste *post-hoc* de Dunn evidenciou que o efeito de imobilidade observado em *C. silvestrii* para as três amostras de efluente (sem MPOs) apresentaram diferenças significativas entre a amostra controle e as diluições 50% (*p*-valor de 0,0173 (reator M1); 0,0055 (reator Ac); 0,0116 (reator M2)) e 100% (*p*-valor de 0,0082 (reator M1); 0,0023 (reator Ac); 0,0116 (reator M2)). Já para as amostras de esgoto contendo MPOs, as diferenças significativas foram observadas até a diluição de 25% para os ensaios com as amostras afluente, e efluente do reator Ac (*p*-valor de 0,0045 (afluente); 0,0049 (reator Ac)).

Para as amostras do reator M1 (fase única) e M2 (fase dupla), as diferenças significativas foram observadas nas diluições 50% (*p*-valor de 0,0042 (reator M1); 0,0047 (reator M2)) e 100% (*p*-valor de 0,0472 (reator M1); 0,0214 (reator M2)). Em todos os casos, estatisticamente, onde não foram identificadas diferenças significativas ao controle, as demais diluições são consideradas “não-tóxicas” para os ensaios letais com *C. silvestrii*. Além disso, na diluição 25% (contendo MPOs) foi possível observar reduções significativas no efeito letal quando comparada ao afluente da mesma etapa. Já para o reator acidogênico (Ac) quando comparados os resultados entre a etapa sem e com MPOs, foi possível detectar um aumento da toxicidade (estatisticamente), já que na diluição de 25% (contendo MPOs) foram identificadas diferenças significativas ao controle, diferente da etapa sem MPOs, onde, para a mesma diluição não houve diferenças significativas constatadas.

Na Tabela 20, é possível observar as respostas ecotoxicológicas CE₅₀ e CE₁₀, para as exposições com as amostras de esgoto sem e com MPOs.

Tabela 20 – Respostas ecotoxicológicas obtidas após as exposições de toxicidade aguda (48h) de *Ceriodaphnia silvestrii* às amostras de esgoto com e sem MPOs, expressos em CE₅₀ e CE₁₀

Etapa	Estágio	Amostras	CE₅₀ (%)	CE₁₀ (%)
Etapa 1 - Sem MPOs	Fase única	Reator M1	40,96	6,71
	Fase dupla	Reator Ac	17,60	6,70
		Reator M2	35,42	32,01
Etapa 2 - Contendo MPOs	-	Afluente	10,30	4,88
	Fase única	Reator M1	15,66	1,84
		Reator Ac	22,79	9,08
		Reator M2	25,64	7,82

Fonte: Aatoria própria (2022).

Analisando as respostas do CE₅₀, para as exposições com esgoto sem MPOs, o efluente do reator acidogênico (Ac) apresentou maior toxicidade (CE₅₀ de 17,60%), seguido do reator M2 (CE₅₀ de 35,42%) e reator M1 (CE₅₀ de 40,96%). Entretanto, ao comparar os resultados entre os reatores, para avaliar diferenças significativas (como as amostras apresentaram distribuição normal aplicou-se o teste Two-way ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey), evidenciou-se que existiam diferenças significativas entre as respostas do reator Ac e os resultados dos reatores M1 e M2 (p -valor $\leq 2,18 \text{ E}^{-8}$), mas para as interações entre os reatores M1 e M2 não houveram diferenças significativas detectadas (p -valor de 1,0), para as respostas dos ensaios de toxicidade aguda com *C. silvestrii*. Os resultados para CE₁₀ também tiveram o mesmo padrão de toxicidade observados na concentração de efeito em 50% dos organismos, com a toxicidade sendo maior em: Reator Ac > Reator M1 > Reator M2.

Com relação aos resultados das amostras contendo MPOs, as respostas de toxicidade expressas em CE₅₀ indicaram o afluente (CE₅₀ de 10,30%) como amostra com maior toxicidade para a espécie Cladocera, seguida dos efluentes dos reatores M1 (CE₅₀ de 15,66%), Ac (CE₅₀ de 22,79%) e M2 (CE₅₀ de 25,64%). Para as comparações entre os reatores (Two-Way ANOVA), as únicas respostas que não tiveram diferenças significativas foram os resultados das amostras dos reatores Ac e M2 (p -valor de 0,889), sendo nesse caso, estatisticamente semelhantes. Na Tabela 21, é possível observar a redução da toxicidade (CE₅₀) das amostras contendo MPOs, tratadas nos reatores anaeróbios. Nesse caso, o tratamento em duplo estágio foi mais eficiente na redução da toxicidade aguda para *C. silvestrii*.

Tabela 21 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*

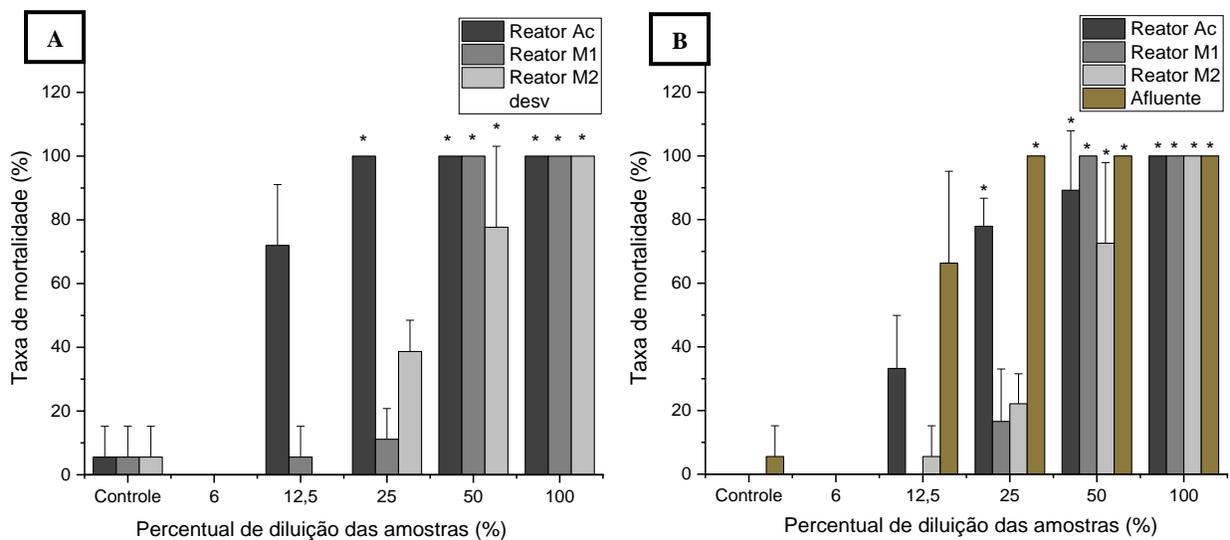
Etapa	Estágio	Amostras	Redução da toxicidade (%)
	Fase única	Reator M1	34,23
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase dupla	Reator Ac	54,80
		Reator M2	59,83

Fonte: Autoria própria (2022).

5.3.2 *Pristina longiseta*

As respostas para os ensaios letais com *P. longiseta* na etapa sem MPOs indicaram que o efluente do reator acidogênico (Ac) foi responsável por significativa taxa de mortalidade em concentrações acima de 12,5%, enquanto as respostas para o efluente do reator metanogênico 2 (M2) indicaram a menor toxicidade letal para o organismo bentônico. Para todas as amostras efluente, o esgoto sintético bruto (100%), apresentou letalidade total dos organismos, assim como ocorreu com *C. silvestrii*. Com relação as diferenças significativas entre amostras (sem MPOs) e o controle, o teste de Kruskal-Wallis indicou que houveram diferenças significativas entre os resultados (p -valor $\leq 0,05$) o que foi avaliado em sequência a partir do teste *post-hoc* de Dunn. Nesse caso, evidenciou-se que os resultados para as amostras do reator acidogênico (Ac) nas diluições até 25% apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle (p -valor de 0,0130 para 25, 50 e 100%), indicando nesse caso, efeito tóxico até essa diluição. Para as outras amostras efluente, as diferenças significativas foram observadas nas diluições de 50% (p -valor de 0,0265 (reator M1); 0,0439 (reator M2)) e 100% (p -valor de 0,0265 (reator M1); 0,0111 (reator M2)). Observa-se na Figura 21 os resultados para os ensaios de toxicidade aguda com *P. longiseta*, para amostras com e sem MPOs.

Figura 21 - Ensaios de toxicidade aguda com *Pristina longiseta* (A: Organismos expostos a esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)



Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

*Indicam diferenças estatísticas significativas entre a diluição e a amostra controle

Fonte: Autoria própria (2022).

Para os ensaios com amostras contendo MPOs, o afluente aos reatores apresentou resultados de toxicidade letal maiores que as amostras tratadas pelos reatores anaeróbios. Entretanto, quando comparados os resultados entre exposições com e sem MPOs, as amostras do reator acidogênico indicaram maior toxicidade para amostras de esgoto sintético apenas com micronutrientes (efeito letal acima de 70% na diluição 12,5%), enquanto que para a mesma diluição para o esgoto com MPOs, a letalidade foi próxima de 35%. É importante ressaltar, que estatisticamente, ambas diluições não apresentaram diferenças significativas ao controle. Nesse contexto, ao analisar os resultados dos ensaios contendo MPOs, o teste de Kruskal-Wallis indicou que houveram diferenças significativas entre os resultados da toxicidade para as quatro amostras (p -valor $\leq 0,05$). O teste *post-hoc* de Dunn evidenciou que nas diluições 50% (p -valor de 0,0130 (afluente); 0,010 (reator M1); 0,0116 (reator Ac); 0,0153 (reator M2)) e 100% (p -valor de 0,0130 (afluente); 0,0100 (reator M1); 0,0031 (reator Ac); 0,0036 (reator M2)) todas os resultados apresentaram diferenças significativas ao controle, já na diluição de 25% (p -valor de 0,0130 (afluente); 0,0487 (reator Ac)) apenas as respostas dos testes com o afluente e amostra do reator acidogênico tiveram diferenças significativas constatadas.

As concentrações de efeito letal observadas em 10 e 50% (Tabela 22), na etapa sem MPOs, indicaram que para as exposições com *P. longiseta*, os efluentes que apresentaram o menor efeito tóxico foram os proveniente dos reatores M1 (CL_{50} de 30,73%) e do reator M2 (CL_{50} de 29,87%). Quando avaliados acerca da similaridade das interações no teste de *post-hoc* de Tukey, as respostas dos efluentes dos reatores M1 e M2 não tiveram diferenças significativas entre si, indicando similaridade para os resultados dos testes letais (p -valor de 0,9998). Os ensaios com amostras efluente do reator Ac apresentaram maior letalidade para o *Oligochaeta* (CL_{50} de 11,45%), e as interações entre os reatores tiveram como resposta diferenças significativas entre os resultados das exposições entre os outros dois reatores (p -valor $\leq 0,05$).

Os resultados dos ensaios letais com esgoto sintético contendo MPOs (Tabela 22) indicaram que as amostras do reator M2 (fase dupla) foram responsáveis pela menor toxicidade (CL_{50} de 37,03%), seguido do reator M1 (CL_{50} de 26,60%), e Ac (CL_{50} de 15,66%), um comportamento semelhante ao que ocorreu com as exposições das amostras dos reatores da etapa 1. Ao analisar as interações entre os resultados das exposições contendo MPOs, foi constatado que apenas os resultados das exposições com as amostras dos reatores M1 e M2 não houveram

diferenças significativas detectadas (p -valor de 0,8699), indicando nesse caso, que estatisticamente os resultados da toxicidade para as amostras dos dois reatores foram semelhantes, assim como na etapa 1 (sem MPOs).

Tabela 22 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após as exposições de toxicidade aguda (48h) de *Pristina longiseta* às amostras de esgoto com e sem MPOs, expressos em CE_{50} e CE_{10}

Etapa	Estágio	Amostras	CL₅₀ (%)	CL₁₀ (%)
Etapa 1 - Sem MPOs	Fase única	Reator M1	29,87	24,75
	Fase dupla	Reator Ac	11,45	11,40
		Reator M2	30,73	14,78
Etapa 2 - Contendo MPOs	-	Afluente	11,59	10,90
	Fase única	Reator M1	26,60	24,44
		Reator Ac	15,66	7,78
	Fase dupla	Reator M2	37,03	19,08

Fonte: Autoria própria (2022).

Ao analisar a redução da toxicidade (Tabela 23), observou-se que tratamento de fase dupla (reator M2) foi responsável pela maior redução percentual da letalidade de *P. longiseta* em termos de CE_{50} , seguido do reator de fase única (M1). Enquanto o reator Ac, apresentou a menor redução da toxicidade letal (26%), mas contribuiu significativamente para redução da toxicidade letal.

Tabela 23 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade aguda com *Pristina longiseta*

Etapa	Estágio	Amostras	Redução da toxicidade (%)
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase única	Reator M1	56,43
	Fase dupla	Reator Ac	25,99
		Reator M2	68,70

Fonte: Autoria própria (2022).

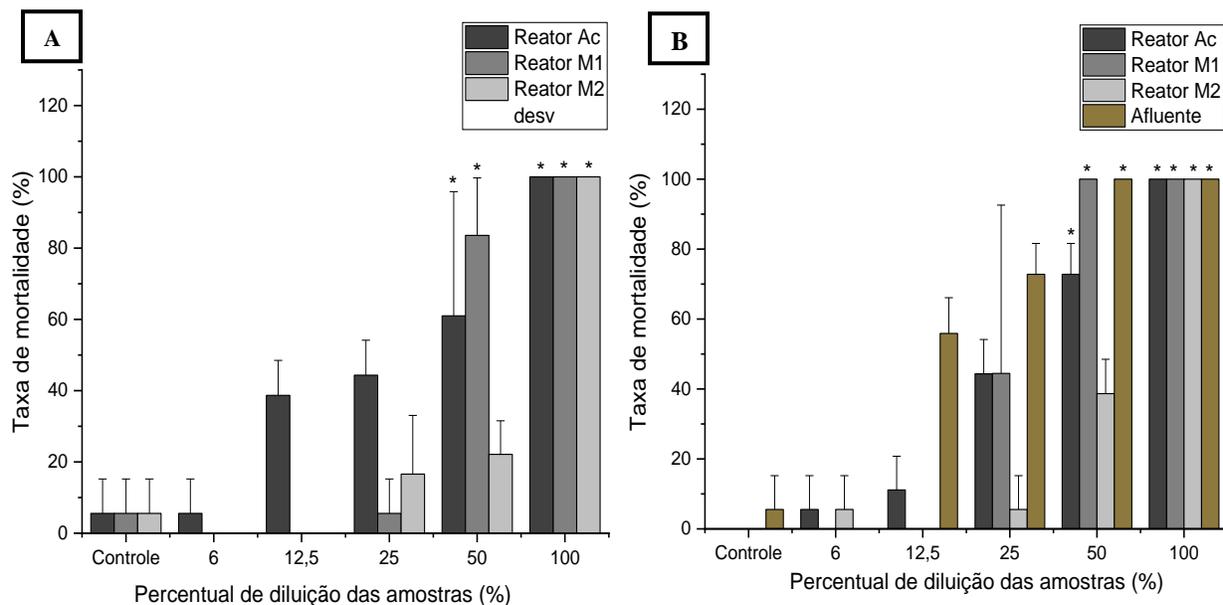
5.3.3 *Allonais inaequalis*

As respostas dos ensaios de toxicidade aguda com *A. inaequalis* também indicaram letalidade total nas concentrações de 100% de todas as amostras estudadas. Com relação às amostras sem MPOs (etapa 1), o efluente do reator M2 (fase dupla) foi responsável pela menor

taxa letal dos *Oligochaeta*. Além disso, as exposições com amostras do reator M1 (fase única) em 50% apresentaram maior efeito letal quando comparadas às amostras do reator acidogênico (Ac) para a mesma diluição, embora, nas diluições seguintes (12,5 e 25%), os ensaios com as amostras do reator M1 indicaram menor efeito tóxico letal que as amostras do reator Ac. O teste de Kruskal-Wallis evidenciou que houveram diferenças significativas para os resultados de cada reator (p -valor $\leq 0,05$), destacadas pelo *post-hoc* de Dunn. Todas as amostras apresentaram diferenças significativas ao controle em 100% (p -valor de 0,0224 (reator M1); 0,023 (reator Ac); 0,0150 (reator M1)). Apenas a amostra do reator Ac teve diferenças significativas detectadas na diluição de 50% (p -valor de 0,0348).

Igualmente, para os resultados dos ensaios com MPOs (etapa 2), foram observadas diferenças significativas entre as medianas para todas as amostras, por meio da análise de Kruskal-Wallis (p -valor $\leq 0,05$). O teste *post-hoc* de Dunn indicou que essas diferenças significativas aos resultados da amostra controle, foram observadas para todos os resultados dos reatores na concentração de 100% (p -valor de 0,00270 (afluente); 0,111 (reator M1); 0,0150 (reator Ac); 0,0036 (reator M2)), e para as amostras dos reatores Ac e M1 em 50% (p -valor de 0,111 (reator M1); 0,0136 (reator Ac)), o que também foi constatado na etapa sem MPOs. Além disso, também foi possível observar através dos resultados para amostras afluente e efluentes, que os reatores foram capazes de reduzir a toxicidade letal em *A. inaequalis*, e que as respostas para o reator M2 (dupla fase) indicaram menor efeito tóxico. Visualmente, os resultados para as amostras dos reatores Ac e M1 foram semelhantes. Observa-se na Figura 21, as taxas de mortalidade de *A. inaequalis* expostos às diferentes diluições das amostras de reatores das etapas com e sem MPOs.

Figura 22 - Ensaio de toxicidade aguda com *Allonais inaequalis* (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)



Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

*Indicam diferenças estatísticas significativas entre a diluição e a amostra controle

Fonte: Autoria própria (2022).

Ao investigar as diferenças significativas das interações entre reatores na etapa contendo MPOs (através do Two-way ANOVA), apenas os resultados das amostras do reator Ac e M1 tiveram semelhanças detectadas, a partir do teste *post-hoc* de Tukey (p -valor de 0,9095). Indicando assim, que estatisticamente a mediana desses resultados é semelhante, e, portanto, evidenciariam o mesmo resultado de toxicidade. Nesse contexto, na Tabela 24 é possível observar as concentrações letais para 50 e 10% dos organismos (CL_{50} e CL_{10}) para as amostras sem e com MPOs. Para a etapa sem MPOs, o reator M2 (fase dupla) foi responsável pela menor toxicidade letal (maior valor de CL_{50}), com um CL_{50} de 58,54%, seguido do reator M1 (fase única), com CL_{50} de 38,92%, e do reator Ac, com CL_{50} de 25,86%. As concentrações letais em 10% também tiveram comportamento de toxicidade semelhante ao observado no CL_{50} .

Tabela 24 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após as exposições de toxicidade aguda (96h) de *Allonais inaequalis* às amostras de esgoto com e sem MPOs, expressos em CL₅₀ e CL₁₀

Etapa	Estágio	Amostras	CL₅₀ (%)	CL₁₀ (%)
Etapa 1 - Sem MPOs	Fase única	Reator M1	38,92	27,62
	Fase dupla	Reator Ac	25,86	5,26
		Reator M2	58,54	44,32
Etapa 2 - Contendo MPOs	-	Afluente	13,35	5,65
	Fase única	Reator M1	25,61	20,21
		Reator Ac	28,98	10,81
		Reator M2	53,70	31,70

Fonte: Autoria própria (2022).

Na etapa contendo MPOs, o resultado das respostas ecotoxicológicas (concentrações letais) indicaram que as concentrações de efeito letal nesta fase foram mais baixas que na etapa 1 (sem MPOs), evidenciando que, como esperado, a inserção dos MPOs no meio intensificou a toxicidade das amostras. Além disso, assim como na etapa 1, o reator M2 apresentou a menor toxicidade letal em 50% dos organismos (CL₅₀ de 53,7%), seguido do reator Ac (CL₅₀ de 28,98%) e M1 (CL₅₀ de 25,61%). O afluente apresentou efeito tóxico letal de 13,35%, constatando que os reatores apresentaram diminuição da sua toxicidade (Tabela 25). Com relação a redução da toxicidade letal para *A. inaequalis*, a combinação dos reatores em duas fases foi responsável pelas maiores reduções da toxicidade, tendo o reator M2 (fase dupla) apresentado redução de 75,13%, enquanto as amostras dos reatores Ac tiveram redução de 53,93%. Já o reator de fase única teve o menor percentual de redução da toxicidade letal do esgoto contendo MPOs para os espécimes de *A. inaequalis*, com 47,87% de redução.

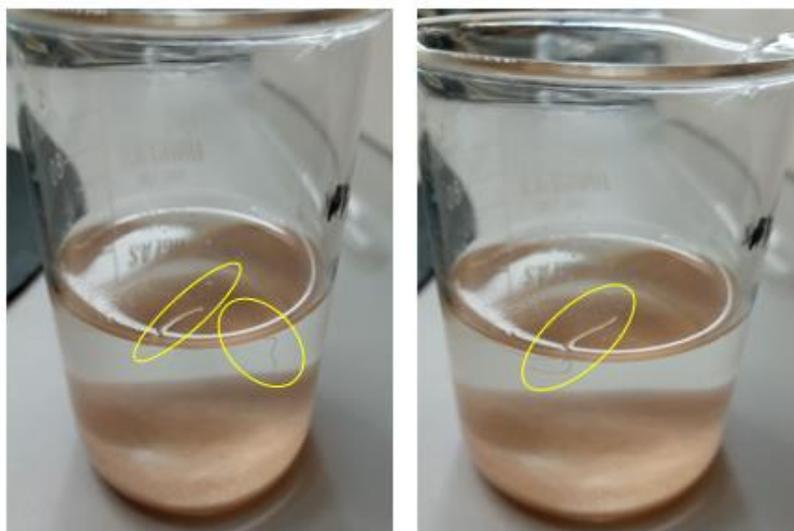
Tabela 25 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade aguda com *Allonais inaequalis*

Etapa	Estágio	Amostras	Redução da toxicidade (%)
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase única	Reator M1	47,87
	Fase dupla	Reator Ac	53,93
		Reator M2	75,13

Fonte: Autoria própria (2022).

Além disso, ao observar os ensaios com *A. inaequalis* foi constatado em cinco amostras, para ensaios com efluente do M1 e M2 (diluições de 25 e 50%) (Figura 23), que alguns indivíduos haviam ido para as extremidades do béquer, ficando parcialmente fora da superfície da água. Em condições de cultivo em laboratório, o organismo também apresenta esse comportamento de deslocamento para as extremidades das bandejas. Entretanto, no caso das exposições com as amostras contendo MPOs, isso poderia ser considerado um mecanismo de fuga do ambiente tóxico, visto que, nesses casos a maior parcela dos organismos sobreviventes nos ensaios (principalmente em 50%) haviam sido justamente os que ficaram parcialmente fora da coluna d'água.

Figura 23 - Comportamento de *Allonais inaequalis*



Fonte: Autoria própria (2022).

Naturalmente, muitas espécies da família Naididae podem ser identificadas em zonas ripárias, em ambientes com baixo volume de água, já tendo sido observadas até mesmo em solo sem água em regiões tropicais (COLLADO; SCHMELZ, 2002; GORNI et al., 2018; OHTAKA, 2018). Entretanto, no geral são organismos com baixa tolerância a ambientes secos, não sobrevivendo por muito tempo nesses ambientes (OHTAKA, 2018). Nesse contexto, *Allonais inaequalis*, é uma espécie que já foi detectada em diferentes zonas do ambiente aquático, como os sedimentos da margem e do fundo de rios, em macrófitas submersas, e associado ao molusco

Pomacea bridgesii, em suas conchas (ALVES; GORNI, 2006; ALVES; GORNI, 2007; SANCHES et al., 2016; GORNI et al., 2018). Por ser uma espécie que circula mais facilmente pelas diferentes zonas do ambiente aquático, o Oligochaeta pode ter utilizado desse mecanismo para tentar fugir da contaminação.

5.3.4 Impactos ecotoxicológicos

Em ambientes naturais, a presença de elevada concentração de matéria orgânica tem uma relação direta com a diminuição da riqueza de espécies a longo prazo, tendo em vista que o aumento da turbidez, fósforo e nitrogênio, disponibilizados a partir dos processos de digestão microbiana tendem a favorecer plantas aquáticas e, em consequência, diminuem a abundância de peixes, além dos impactos na comunidade bentônica (GALLARDO et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2018 WANG et al., 2021). Além disso, alguns estudos ecotoxicológicos indicam que a carga orgânica também é capaz de influenciar a toxicidade para alguns contaminantes, principalmente metais e nanopartículas, acarretando em redução dos efeitos tóxicos observados (LOCK; JANSSEN, 2001; SEITZ et al., 2016; ARVIDSSON et al., 2020).

Nesse contexto, para a etapa sem MPOs, *P. longiseta* foi o organismo mais sensível as amostras dos três reatores, com os menores valores de concentração de efeito letal, seguido do microcrustáceo *C. silvestrii*, e o Oligochaeta *A. inaequalis*. Além disso, apenas os subprodutos gerados na digestão anaeróbia (ácidos graxos, amônia, sulfeto/sulfato, álcoois e outros), carga orgânica remanescente e sais, já foram capazes de conferir elevada toxicidade para a biota aquática, com CL₅₀ próximos a 12% nos ensaios com *P. longiseta* (amostra do reator Ac) (YUAN; ZHU, 2016). Também, a menor presença de carbonatos de cálcio nas amostras dos reatores Ac (tanto na etapa 1, quanto na 2), em comparação às outras amostras dos reatores (M1 e M2), pode ter relação com os maiores valores de toxicidade identificados.

Quando comparadas as duas espécies da família Naididae, a literatura indica que de fato *P. longiseta* apresenta maior sensibilidade que *A. inaequalis*, quando comparadas as respostas das exposições com as substâncias de referência (substâncias inorgânicas). Corbi et al. (2015), calcularam a CL₅₀ de 3,5 e 0,159 g/L para exposições de toxicidade com *A. inaequalis* utilizando cloreto de potássio (KCl) e cloreto de zinco (ZnCl₂), respectivamente. Já Castro et al. (2020),

estimaram CL_{50} de 1,76 e 0,0065 g/L, em ensaios utilizando *P. longiseta* para as mesmas substâncias de referência indicadas por Corbi et al. (2015), constatando que para essas amostras, *A. inaequalis* apresentou maior resistência letal. É importante ressaltar, que *P. longiseta* é um organismo que ainda não foi bem explorada em ensaios de toxicidade (tanto exposições agudas, quanto crônicas), e o grupo de pesquisadores do LEAA vêm desenvolvendo novas metodologias de estudos ecotoxicológicos com a espécie desde 2019/2020, não tendo produzido ainda um amplo material exploratório dos efeitos tóxicos para esse organismo.

Além disso, alguns estudos que detectaram e identificaram Oligochaeta em córregos urbanos no Brasil, indicam que *A. inaequalis* é uma espécie abundante em ambientes com maior carga orgânica em comparação com *P. longiseta*. Sanches et al. (2016), observaram em córregos de Bocaina – SP, que a densidade de *A. inaequalis* foi maior em áreas com elevada carga orgânica e sais (condutividade entre 183,5 e 356,67 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e oxigênio (OD entre 4,15 e 5,87), que os espécimes coletados de *P. longiseta* na mesma área. Tal fato também foi constatado por Alves et al. (2006), que observaram em áreas com elevada carga orgânica, um número superior de espécimes de *A. inaequalis*, em comparação com *Pristina spp.* Dessa forma, a presença de carga orgânica e sais poderia ter influência no desenvolvimento das espécies, assim como o apontado nos ensaios ecotoxicológicos desta pesquisa.

Ceriodaphnia silvestrii também se mostrou sensível às amostras da etapa 1, em particular, ao efluente do reator Ac (CE_{50} de 17,6%), o que também foi observado para *A. inaequalis* (CE_{50} de 25,9%), e *P. longiseta*, como mencionado anteriormente. Em geral, na etapa de digestão acidogênica, alguns subprodutos que podem induzir toxicidade são gerados, como o dióxido de carbono (CO_2), amônia (NH_3), sulfeto de hidrogênio (H_2S) e acetato (CH_3CO_2) (LETTINGA, 1995; ZHAO et al., 2021). Guais et al. (2001), em uma revisão bibliográfica, pontuaram efeitos inflamatórios, carcinogênicos e no desenvolvimento e reprodução de animais, decorrentes das exposições de CO_2 . Outros autores também elencam efeitos adversos em organismos aquáticos, dos subprodutos gerados na etapa acidogênica (RANDALL; TSUI, 2002; TOBLER et al., 2006; FADL et al., 2019; KIM et al., 2020). Por outro lado, não é possível durante o processo de digestão anaeróbia (na etapa acidogênica), estabilizar a maior parte dos compostos, sendo o grupo das arqueas metanogênicas (na fase seguinte de degradação) responsáveis por digerir e estabilizar a maior parcela dos contaminantes.

Nesse contexto, Garcia-Morales et al. (2001), estabelecem que os microrganismos presentes no reator na etapa acidogênica são mais sensíveis a compostos tóxicos do que os organismos das fases subsequentes, sendo esperado nesse caso, que a eficiência de remoção nesta etapa para alguns MPOs fosse menor que nas etapas seguintes. Entretanto, existem alguns MPOs que são degradados/biotransformados durante a etapa acidogênica, justificando as significativas reduções da toxicidade para algumas espécies já nessa etapa do tratamento anaeróbio (DUAN et al., 2019). Neste caso, assim como foi observado, já se esperava que as amostras do reator Ac conferissem maior toxicidade para os organismos aquáticos (que as amostras da etapa metanogênica), mas de fato não se havia compreensão acerca da sua contribuição para redução da toxicidade das amostras.

Todos os organismos apresentaram mortalidade total às exposições com amostra afluyente, que tinham concentrações nominais de 50 µg/L de cada MPOs. Além disso, os resultados das amostras contendo MPOs, apontaram que a *C. silvestrii* foi o organismo que apresentou as menores concentrações de efeito CE₅₀ (nas amostras afluyente, reatores M1 e M2), indicando que o microcrustáceo foi mais sensível a presença dos micropoluentes que os Oligochaeta. Por serem organismos que se alimentam através da filtração da água, os microcrustáceos podem ser mais vulneráveis a poluentes em baixas concentrações no meio, como é o caso dos MPOs (PRICHARD; GRANEK, 2016; ROSNER et al., 2021).

Para contaminações com metais, por exemplo, geralmente os organismos aquáticos mais afetados são as espécies bentônicas, principalmente pela precipitação e acumulação dos metais em sedimentos (GRAZANO-NETO et al., 2018; LIRA et al., 2018). Observando por essa ótica, no caso dos MPOs, os efeitos observados na espécie Cladocera podem estar associados a maior disponibilidade desses contaminantes na coluna d'água (na forma dissolvida e/ou volatilizada), enquanto para as amostras apenas com micronutrientes (etapa 1) a *P. longiseta* foi o organismo mais sensível (ZARANYIKAUM; DZOMBAUMB, 2022). Pinheiro (2020), observou maior efeito tóxico letal em esgoto bruto (DQO de 351,0 mg O₂/L) para organismos bentônicos (*A. inaequalis* (CL₅₀ de 13,5%), *P. longiseta* (CL₅₀ de 14,6%) e *C. santicaroli* (CL₅₀ de 12,2%)), em comparação com o microcrustáceo *C. silvestrii* (CE₅₀ de 62,3%). O autor pontua, que a presença de carga orgânica, lodo e sólidos sedimentáveis presentes no esgoto real, influenciou mais fortemente o ciclo desses organismos em comparação ao Cladocera.

Além disso, Carneiro et al. (2021), ao analisar o efeito do esgoto doméstico (real e sintético) contendo os antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina, em mistura e também isolados, tratados por reator anaeróbio de leito fixo (DQO média de 296 mg/L (afluente) e 19,3 mg/L (efluente)), pontuaram que em concentrações de até 40 µg/L, as amostras afluente e efluente ao reator apresentaram letalidade total do Oligochaeta *A. inaequalis*. Entretanto, para o inseto *C. santicaroli*, as mesmas exposições não tiveram efeito negativo, com as larvas sobrevivendo até mesmo em concentrações de 3 mg/L. Evidenciando assim, a necessidade da realização de ensaios ecotoxicológicos em uma gama maior de organismos, além de pontuar o potencial tóxico das amostras sanitárias, mesmo com elevada eficiência de remoção dos compostos emergentes.

No caso da etapa com MPOs, *P. longiseta* apresentou a segunda maior sensibilidade às amostras, seguido de *A. inaequalis*. As concentrações de efeito para o reator M2 (fase dupla), indicaram que a separação das fases (na etapa metanogênica) fez com que houvesse maior eficiência na redução da toxicidade para as três espécies, tendo *C. silvestrii* (redução de 59,8%), *P. longiseta* (redução de 68,7%), *A. inaequalis* (redução de 75,1%). Tecnologias de pós-tratamento do esgoto doméstico, poderiam nesse caso, contribuir para a redução total da letalidade para os organismos.

Nesse contexto, Freitas et al. (2017), investigaram o processo oxidativo avançado (POA) foto-Fenton solar, como alternativa de tratamento terciário para remover contaminantes residuais do tratamento biológico de esgoto doméstico por lodos ativados. Os autores observaram que após o tratamento aeróbio ainda se identificava um total de 39 MPOs (principalmente antibióticos, anti-inflamatórios e antidepressivos), em uma concentração média geral de 80 µg/L. Essa fração nas amostras de esgoto doméstico foi suficiente para gerar um efeito letal (imobilidade) em 20% dos neonatos de *Daphnia magna* (48 horas de exposição). Após a aplicação do POA, esse efeito decaiu para apenas 5%, evidenciando a eficiência de um tratamento químico posterior na remoção dos poluentes e, conseqüentemente, diminuindo a toxicidade para as espécies aquáticas.

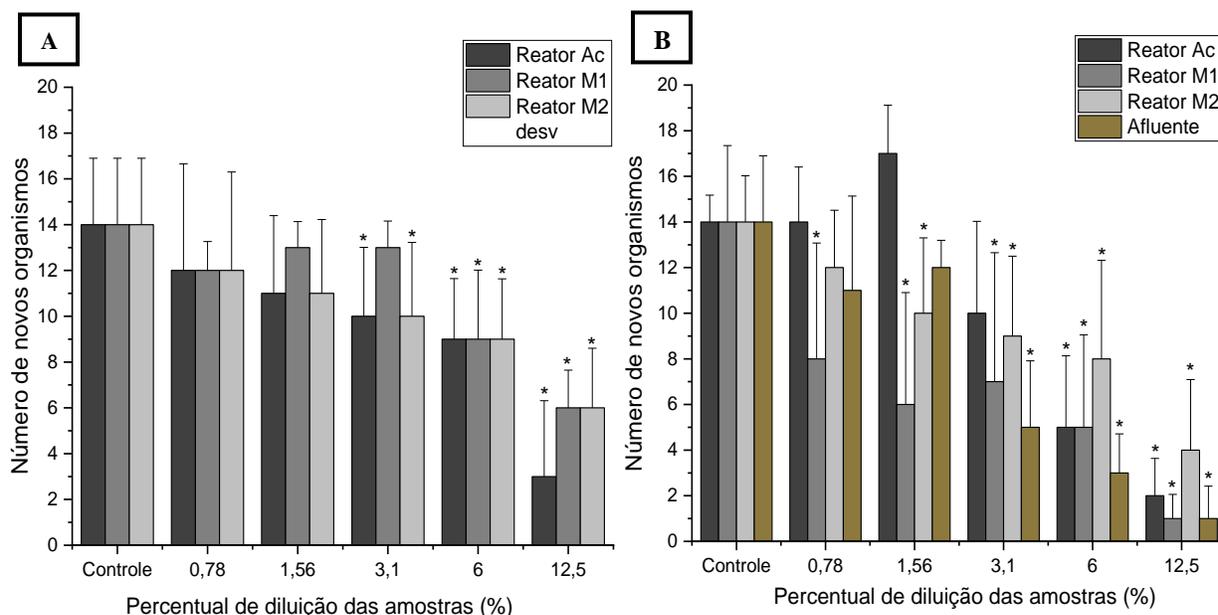
5.4 Ensaios de toxicidade crônica

5.4.1 *Ceriodaphnia silvestrii*

Os organismos de *C. silvestrii* apresentaram maior sensibilidade às exposições crônicas, acarretando em efeitos na reprodução em diluições mais baixas que as outras duas espécies, para os ensaios com e sem MPOs. Na etapa 1, os resultados para as amostras do reator Ac indicaram maior efeito na reprodução do Cladocera na diluição 12,5%, enquanto que a amostra do M1 teve menor efeito inibitório na reprodução. Com relação às diferenças significativas, por se tratar de um conjunto maior de dados (10 réplicas por diluição), os resultados apresentaram distribuição normal ($p \geq 0,05$ no teste de Shapiro-Wilk), sendo aplicado o One-Way ANOVA, que indicou que houveram diferenças significativas nos resultados das 3 amostras efluente aos reatores (M1, Ac e M2). Em sequência, o *post-hoc* de Dunn evidenciou que nas diluições 6,0% (p -valor de 0,0002 (reator M1); 0,0028 (reator Ac); 0,0013 (reator M2)) e 12,5% (p -valor de $6,66 \times 10^{-7}$ (reator M1); $5,45 \times 10^{-7}$ (reator Ac); $6,66 \times 10^{-7}$ (reator M2)) todas amostras (Ac, M1 e M2) apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) aos resultados da amostra controle. Na diluição 3,1% (p -valor de 0,020 (reator Ac); 0,0019 (reator M2)), apenas os resultados dos reatores Ac e M2 também indicaram diferenças significativas (Figura 24A). Nesse caso, para essas amostras, os resultados indicam que apenas nas diluições 0,78; 1,56, todas as amostras (M1, Ac e M2) foram consideradas estatisticamente “sem efeito tóxico” na reprodução de *C. silvestrii*.

Os resultados dos ensaios com as amostras contendo MPOs (Figura 24B) tiveram um comportamento semelhante a etapa 1, com os reatores de fase dupla apresentando menor impacto na inibição da reprodução de *C. silvestrii*, em comparação com o reator de fase única, principalmente nas maiores diluições (6 e 12,5%). Nesse caso, o teste One-Way ANOVA indicou que houveram diferenças significativas em cada um dos os ensaios (p -valor $\leq 0,05$), e o *post-hoc* de Dunn evidenciou essas diferenças ao controle. Nesse caso, os resultados considerados “não-tóxicos” (p -valor $\geq 0,05$) para a reprodução da espécie Cladocera, ocorreram nas diluições 0,78% (p -valor de 0,1229 (Afluente); 0,8673 (reator Ac); 0,1148 (reator M2)), 1,56% (p -valor de 0,3191 (Afluente); 0,141 (reator Ac) e 3,1% (p -valor de 0,0998 (reator Ac)).

Figura 24 - Ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)



Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

*Indicam diferenças estatísticas significativas entre a diluição e a amostra controle

Fonte: Autoria própria (2022).

Ao investigar as interações entre as repostas das amostras dos reatores (através do Two-Way ANOVA), observou-se que haviam diferenças significativas entre os resultados da toxicidade (p -valor $\leq 0,05$), evidenciando-se por meio do *post-hoc* de Tukey que os resultados das exposições com as amostras dos reatores de fase dupla (Ac e M2) não apresentaram diferenças significativas entre si (p -valor de 0,6749), enquanto as outras amostras (afluente e reator M1) tiveram diferenças significativas observadas.

Com relação às concentrações de efeito, na etapa sem MPO, a amostra do reator M2 apresentou o menor efeito tóxico reprodutivo (CE_{50} de 10,26%), seguido da amostra do reator M1 e Ac (CE_{50} de 8,41 e 5,69%, respectivamente). As concentrações de efeito em 10% (toxicidade inicial) dos organismos tiveram um padrão de toxicidade diferente do CE_{50} , já que nesse caso, mesmo a amostra do reator M2 apresentando menor toxicidade que as outras (afluente, reator Ac e M1), uma menor fração dessa amostra (CE_{10} de 0,58%) já foi responsável por efeitos tóxicos iniciais na reprodução de *C. silvestrii*, enquanto o CENO indicava efeito de toxicidade observada a partir de 1,56%. Beasley et al. (2015), apontam que CE_{10} e o CENO são respostas análogas em

exposições crônicas, e que ambas indicam a menor fração da amostra sem efeito tóxico detectado. Na tabela 26, é possível observar as respostas ecotoxicológicas (CE₅₀; CE₁₀; CENO e CEO), para as exposições com amostras com e sem MPOs.

Tabela 26 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após exposições crônicas (7d) de *Ceriodaphnia silvestrii* às amostras de esgoto das etapas 1 e 2, expressos em CE₁₀, CE₅₀, CENO e CEO

Etapa	Estágio	Amostras	CE₅₀ (%)	CE₁₀ (%)	CENO (%)	CEO (%)
Etapa 1 - Sem MPOs	Fase única	Reator Ac	5,69	3,01	1,56	3,1
	Fase dupla	Reator M1	8,41	3,54	3,1	6,0
		Reator M2	10,26	0,58	1,56	3,1
	-	Afluente	3,72	0,65	1,56	3,1
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase única	Reator M1	1,33	0,04	-	0,78
	Fase dupla	Reator Ac	4,56	2,47	3,1	6,0
		Reator M2	5,96	0,43	0,78	1,56

Fonte: Autoria própria (2022).

Para os ensaios da etapa com MPOs, a amostra que apresentou menor toxicidade foi a proveniente do reator M2 (fase dupla), assim como na etapa 1. Embora com uma concentração de efeito quase 50% inferior (CE₅₀ de 5,96%), indicando que os MPOs contidos na amostra agregaram toxicidade ao efluente. As respostas das exposições com o reator M1 (fase única) foram as mais baixas detectadas (CE₅₀ de 1,33%), sendo inclusive mais tóxica que a amostra afluente. Enquanto que para as amostras do reator Ac (CE₅₀ de 4,56%), a concentração de efeito foi próxima ao observado nos ensaios com amostras do M1. Nesse caso, pode ter ocorrido durante o processo de degradação metanogênica em estágio único (para os reatores M1 e M2), uma menor fração da remoção dos MPOs, ou até mesmo, a formação de moléculas e subprodutos mais tóxicos que as não metabolizadas, afetando toxicamente a reprodução de *C. silvestrii* (MAJEWSKY et al., 2014). Além disso, não foi possível para a amostra do reator M1 calcular um CENO, já que até mais baixa diluição foram observados efeitos significativos na reprodução da espécie.

As concentrações de efeito observados (CEO), indicaram que para os resultados da etapa 2, as amostras efluente ao reator Ac e afluente (6,0 e 3,1%, respectivamente) tiveram o efeito tóxico inicial em diluições maiores que as outras duas amostras (0,78 e 1,56%, para M1 e M2, respectivamente), sendo um possível indicador da toxicidade de subprodutos gerados durante o

processo de degradação pelas arqueas metanogênicas. No geral, espécies da ordem Cladocera tendem a ser sensíveis ao esgoto doméstico, principalmente devido aos compostos nitrogenados presentes em amostras reais (NANDINI et al., 2004; KUMAR; KIRAN, 2016; ISSA, 2019). Além disso, embora os microcrustáceos naturalmente apresentem elevada sensibilidade crônica aos MPOs, é importante ressaltar que outras espécies aquáticas podem ser ainda mais sensíveis.

Huang et al. (2014), por exemplo, em exposições crônicas utilizando antibióticos da classe sulfonamida, observaram que os Cladocera *D. magna* e *D. similis* (CE₅₀ de 14,9 mg/L e 41,9 mg/L) apresentaram menor sensibilidade em comparação a espécies de algas *C. vulgaris* e *I. galbana* (CE₅₀ de 5,9 mg/L e 9,7 mg/L). Han et al. (2010), constataram CENO de 1,23 mg/L em ensaios de reprodução com *D. magna*, e um CENO de 0,1 µg/L em ensaios de sobrevivência com o peixe *O. latipes*, ambos organismos expostos à fármacos. Nesses casos, os estudos apontam os microcrustáceos como organismos de sensibilidade intermediária, tendo algumas espécies de peixes e algas sido mais sensíveis em determinados *endpoints*. No geral, os Oligochaeta e insetos tendem a apresentar menor sensibilidade que os Cladocera a uma gama de contaminantes (HIGASSI, 2016; CASTRO et al., 2020a; CASTRO et al., 2022a; CASTRO et al., 2022b). Sendo interessante, a discussão acerca da exposição de uma gama maior de organismos, já que suas sensibilidades são extremamente variáveis, principalmente em exposições com MPOs.

Com relação a redução da toxicidade crônica para *C. silvestrii* (Tabela 27), o reator de fase dupla apresentou os melhores resultados, com redução de 37,6% ao final do reator M2. Enquanto no reator de fase única (M1), a toxicidade aumentou (64%) em comparação a amostra afluyente. Para essa amostra (M1), os resultados de toxicidade crônica corroboram com o debate acerca da possível biotransformação dos MPOs em compostos mais tóxicos, em função da fase do tratamento anaeróbico, já que a amostra (M2) foi mais tóxica que o afluyente contendo MPOs, para os ensaios de reprodução com *C. silvestrii*.

Tabela 27 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii*

Etapa	Estágio	Amostras	Redução da toxicidade (%)
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase única	Reator M1	-64,00
	Fase dupla	Reator Ac	18,42
		Reator M2	37,58

Fonte: Autoria própria (2022).

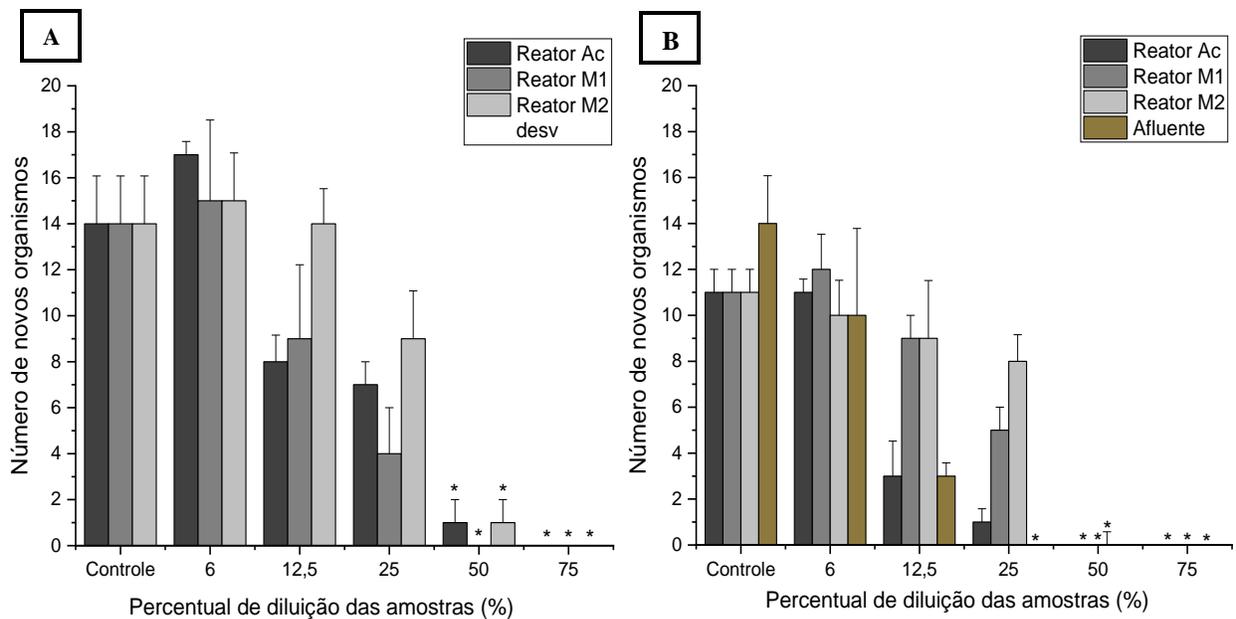
5.4.2 *Pristina longiseta*

As exposições crônicas com *P. longiseta* na etapa 1 (sem MPOs), indicaram que houve impacto na reprodução da espécie ainda nas menores diluições (12,5 e 25%), com as exposições das amostras dos reatores metanogênicos (M1 e M2) conferindo menor toxicidade reprodutiva nos organismos, em comparação com as amostras da etapa acidogênica (Ac). A diluição de 6% não comprometeu negativamente a reprodução do Oligochaeta aquático, em nenhuma das exposições (Figura 25A). Com relação às diferenças significativas ao controle, o teste de Kruskal-wallis indicou que houveram diferenças significativas entre as amostras ($p \leq 0,05$), sendo evidenciadas a partir do teste *post-hoc* de Dunn. As comparações evidenciaram que só houveram diferenças significativas entre os resultados das diluições 50% (p -valor de 0,0075 (reator M1); 0,0405 (reator Ac); 0,0480 (reator M2)) e 75% (p -valor de 0,0075 (reator M1); 0,0079 (reator Ac); 0,0130 (reator M2)), onde as taxas de reprodução e sobrevivência foram próximas a zero. Além disso, na diluição 50% não houve sobrevivência dos organismos para as exposições com efluente do reator M1 (fase única), e na diluição de 75% não houve sobrevivência para nenhuma das exposições (M1, Ac e M2).

Para as exposições com as amostras na etapa contendo MPOs (Figura 25B), os menores efeitos de inibição da reprodução também foram identificados nos efluentes dos reatores metanogênicos (M1 e M2), com a amostra do reator Ac apresentando alta inibição da reprodução nas diluições 12,5 e 25%, e nenhuma sobrevivência nas diluições 50 e 75%. Enquanto para os reatores M1 e M2, em 12,5 e 25%, houve significativa redução do efeito tóxico das amostras para a espécie bentônica, em comparação à amostra afluenta. Além disso, nas exposições com as amostras do reator M2 houve sobrevivência média de 3 organismos na maior diluição (75%), corroborando para a identificação do reator de dupla fase como o responsável pelas maiores

reduções da toxicidade crônica de *P. longiseta*. As diferenças significativas apontadas a partir do teste de *post-hoc* de Dunn ($p \leq 0,05$), indicaram que nas diluições 50% (p -valor de 0,0044 (afluente); 0,0101 (reator M1); 0,0044 (reator Ac); 0,0089 (reator M2)) e 75% (p -valor de 0,0044 (afluente); 0,0101 (reator M1); 0,044 (reator Ac); 0,0035 (reator M2)), todas as respostas tiveram diferenças significativas ao controle. Já na diluição 25%, apenas as exposições com afluente tiveram diferenças significativas detectadas (p -valor de 0,0044).

Figura 25 - Ensaio de toxicidade crônica com *Pristina longiseta* (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)



Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

*Indicam diferenças estatísticas significativas entre a diluição e a amostra controle

Fonte: Autoria própria (2022).

Ao averiguar diferenças significativas a partir de interações entre as respostas observadas em cada reator (Two-Way ANOVA), foi constatado que não houveram diferenças significativas entre os resultados das amostras afluente e reator Ac (p -valor de 0,9698). Por outro lado, para as amostras metanogênicas (M1 e M2), as diferenças significativas às outras respostas dos reatores foram detectadas. Indicando nesse caso, que estatisticamente (baseado na variância), não houve

diminuição da toxicidade crônica (reprodução) para *P. longiseta* no tratamento do reator acidogênico (Ac).

As respostas ecotoxicológicas (Tabela 28), determinaram que na etapa 1, o reator metanogênico de fase dupla (M2) apresentou a maior concentração de efeito na reprodução de 50% dos organismos (CE₅₀ de 27%), seguido do reator Ac (CE₅₀ de 17%) e reator M1 (CE₅₀ de 16%). A concentração de efeito não observado (CENO) foi identificado na diluição de 25% para todas as amostras na etapa 1 (reatores M1, Ac e M2), apontando que até essa diluição, não houveram diferenças significativas evidenciando toxicidade (estatisticamente) na reprodução dos indivíduos. Para as amostras contendo MPOs (etapa 2), todos os ensaios indicaram que houve redução da toxicidade em relação às exposições com a amostra afluenta, e o reator de fase dupla M2 foi o responsável pelo menor impacto na reprodução (CE₅₀ de 32%), seguido do reator de fase única M1 (CE₅₀ de 22%) e reator Ac (CE₅₀ de 10%). O CENO para as amostras efluente aos reatores (M1, Ac e M2) foi observado em 25%, assim como na etapa 1, e para a amostra afluenta ele foi observado em 12,5%, evidenciando o quão a amostra bruta (afluente) de fato foi mais tóxica que as tratadas, para a reprodução de *P. longiseta*.

Tabela 28 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após exposições crônicas (7d) de *Pristina longiseta* às amostras de esgoto das etapas 1 e 2, expressos em CE₁₀, CE₅₀, CENO e CEO

Etapa	Estágio	Amostras	CE₅₀ (%)	CE₁₀ (%)	CENO (%)	CEO (%)
Etapa 1 - Sem MPOs	Fase única	Reator M1	15,97	7,34	25	50
	Fase dupla	Reator Ac	17,39	6,09	25	50
		Reator M2	27,03	16,40	25	50
	-	Afluente	7,98	4,16	12,5	25
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase única	Reator M1	22,43	9,60	25	50
	Fase dupla	Reator Ac	10,49	6,40	25	50
		Reator M2	31,82	23,41	25	50

Fonte: Autoria própria (2022).

Ao comparar as concentrações letais (CL₅₀ - ensaios agudos) e concentrações de efeito na reprodução de *P. longiseta* (CE₅₀ - ensaios crônicos), observou-se que tanto nas amostras da etapa 1, quanto na etapa 2, os resultados identificados foram próximos. Nesse caso, não foram constatadas grandes variações entre efeitos de toxicidade letais e de efeito inibitório na reprodução da espécie, indicando que em uma pequena faixa de variação de diluições, já podem ser observados

efeitos tóxicos em escalas completamente diferentes para o *Oligochaeta* aquático. Por outro lado, as concentrações de efeito em 10% dos organismos (CE_{10}), evidenciaram que os efeitos crônicos iniciais foram observados em diluições bem mais baixas que as concentrações iniciais de letalidade (CL_{10}).

Assim, o reator metanogênico de dupla fase (M2) apresentou a maior eficiência na remoção da toxicidade reprodutiva (75%), seguido dos reatores M1 (64%) e Ac (24%) (Tabela 29). Além disso, os resultados da redução da toxicidade crônica foram próximos aos observados na redução da toxicidade aguda para os ensaios com *P. longiseta*. Evidenciando que os possíveis subprodutos gerados nos diferentes estágios do tratamento anaeróbio, ou micropoluentes residuais, não influenciaram tão fortemente a toxicidade crônica do *Oligochaeta* aquático, em comparação com a toxicidade aguda, como foi o caso do Cladocera *C. silvestrii*.

Tabela 29 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade crônica com *Pristina longiseta*

Etapa	Estágio	Amostras	Redução da toxicidade (%)
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase única	Reator M1	64,42
	Fase dupla	Reator Ac	23,93
		Reator M2	74,92

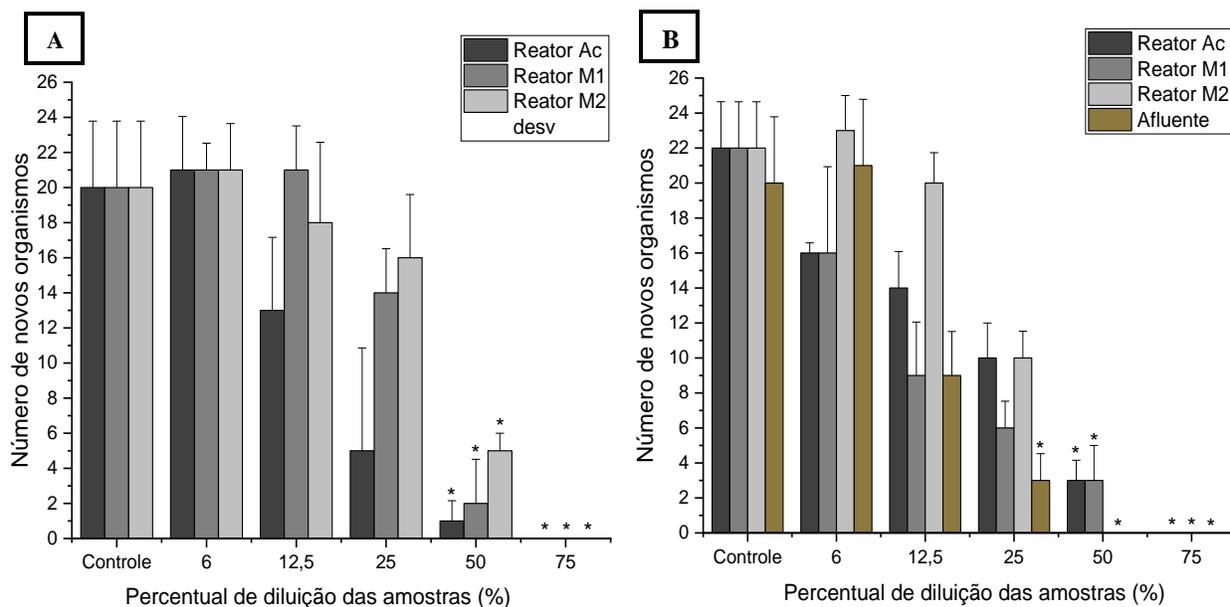
Fonte: Autoria própria (2022).

5.4.3 *Allonais inaequalis*

Foram observados efeitos negativos na reprodução da espécie de *A. inaequalis*, em diluições a partir de 12,5% na etapa sem MPOs, e 6% na etapa com MPOs. Na diluição 50% para as exposições sem MPOs, houve inibição quase total da reprodução nas amostras do reator Ac (fase dupla) e M1 (fase única), e também foi comprovada elevada inibição reprodutiva para as exposições com amostras do M2 (fase dupla) (Figura 26A). As amostras dos reatores metanogênicos (M2 e M1) foram responsáveis no geral pelas menores taxas de inibição da reprodução, enquanto para a amostra do reator Ac houve significativa redução do número de novos organismos ainda nas diluições mais baixas (a partir de 12,5%).

Com relação às diferenças significativas, o teste de Kruskal-Wallis indicou que houveram diferenças detectadas ($p \leq 0,05$) entre os resultados dos ensaios, sendo essas diferenças evidenciadas a partir do teste *post-hoc* de Dunn. Nesse contexto, para todas as amostras (M1, Ac e M2), as diferenças significativas ao controle foram identificadas nas diluições 50% (p -valor de 0,0101 (reator M1); 0,0162 (reator Ac); 0,0410 (reator M2)) e 75% (p -valor de 0,0450 (reator M1); 0,0055 (reator Ac); 0,0076 (reator M2)). Ao investigar as diferenças significativas das interações entre os resultados de cada reator (Two-Way ANOVA), não foram identificadas diferenças entre as respostas dos reatores M1 e M2 (p -valor de 0,9742), apenas entre os resultados do Ac. Tendo nesse caso, ambos os reatores de estágio metanogênico apresentaram resultados semelhantes estatisticamente para respostas de inibição na reprodução de *A. inaequalis*.

Figura 26 - Ensaios de toxicidade crônica com *Allonais inaequalis* (A: Organismos expostos ao esgoto sintético sem MPOs; B: Organismos expostos ao esgoto sintético contendo MPOs)



Ac: Reator acidogênico; M1 e M2: Reatores metanogênicos

*Indicam diferenças estatísticas significativas entre a diluição e a amostra controle

Fonte: Autoria própria (2022).

Para a etapa contendo MPOs, as diferenças significativas evidenciadas a partir do teste *post-hoc* de Dunn ($p \leq 0,05$) foram observadas para todas as amostras, nas diluições 50% (p -valor

de 0,0061 (afluente); 0,0071 (reator M1); 0,0056 (reator Ac); 0,0100 (reator M2)) e 75% (p -valor de 0,0061 (afluente); 0,0006 (reator M1); 0,0005 (reator Ac); 0,0100 (reator M2)), e 25% apenas para a amostra afluente (p -valor de 0,0124) (Figura 26B). Além disso, ao observar os resultados para diferenças significativas entre as interações dos reatores (Two-Way ANOVA), foram evidenciadas diferenças significativas entre os resultados das exposições com todas as amostras estudados ($p \leq 0,05$). No geral, os resultados do reator de fase dupla na etapa metanogênica (M2), indicaram que até a diluição 25%, a amostra foi responsável pelas menores inibições na reprodução da espécie na etapa contendo MPOs.

Com relação às concentrações de efeitos na reprodução (CE_{50}) de *A. inaequalis* na etapa sem MPOs, observou-se que as exposições com amostras das fases metanogênicas foram responsáveis pelo menor efeito tóxico para os ensaios crônicos com *A. inaequalis* (CE_{50} de 36% para M2, e 30% para M1) (Tabela 30). O reator de fase dupla no estágio acidogênico (Ac) apresentou um CE_{50} de 15,5%. Já o CENO, foi observado para os ensaios com as três amostras na diluição de 25%, havendo nesse caso, estaticamente, efeito inicial de toxicidade para todas as amostras (M1, Ac e M2) a partir desta diluição. Por outro lado, avaliando o efeito inicial de toxicidade baseado no CE_{10} , foi possível destacar que o efeito foi estimado em percentuais de diluições distintos, variando entre 6,8% (reator Ac) e em torno de 20% (reatores M1 e M2).

As respostas para os ensaios da etapa com MPOs, indicaram que os reatores de fase dupla foram responsáveis pelas maiores concentração de efeito, M2 (CE_{50} de 24%) e Ac (CE_{50} de 19%). As exposições com amostras do reator de fase única (M1) implicaram em aumento da toxicidade crônica em comparação com a amostra efluente ao reatores, o que também foi observado nos ensaios crônicos com *C. silvestrii* para a mesma amostra. Nesse contexto, reforça-se a teoria da biotransformação dos MPOs em compostos mais tóxicos para a reprodução dessas espécies, durante a fase metanogênica no reator de fase única. Inúmeros mecanismos tendem a influenciar a toxicidade de xenobióticos em seres vivos, seja por vias de exposição, sensibilidade, fatores do sistema biológico e até mesmo interferências externas (como luz e temperatura), podendo diferentes compostos isolados e suas misturas induzirem efeitos totalmente diferentes em espécies do mesmo gênero, por exemplo (VERRENGIA-GUERRERO, 2002; ZAGATO; BERTOLETTI, 2014). Além disso, embora as concentrações de efeito em 50% tenham sido próximas para as amostras do reator de fase dupla (Ac e M2), o efeito inicial de toxicidade (EC_{10}) foi bem mais

baixo para a amostra do reator Ac (5,42%), indicando que o organismo apresentou efeito tóxico em diluições bem inferiores à amostra do M2.

Tabela 30 - Respostas ecotoxicológicas obtidas após exposições crônicas (10d) de *Allonais inaequalis* às amostras de esgoto das etapas 1 e 2, expressos em CE₁₀, CE₅₀, CENO e CEO

Etapa	Estágio	Amostras	CE ₅₀ (%)	CE ₁₀ (%)	CENO (%)	CEO (%)
Etapa 1 - Sem MPOs	Fase única	Reator M1	30,07	18,02	25	50
	Fase dupla	Reator Ac	15,53	6,79	25	50
		Reator M2	36,06	20,22	25	50
Etapa 2 - Contendo MPOs	-	Afluente	12,22	6,24	25	50
	Fase única	Reator M1	10,66	2,28	25	50
	Fase dupla	Reator Ac	19,35	5,42	25	50
		Reator M2	23,95	13,55	25	50

Fonte: Autoria própria (2022).

Assim, os reatores de fase dupla na etapa metanogênica (M2) e acidogênica (Ac), apresentaram os maiores percentuais de redução da toxicidade crônica para *A. inaequalis*, em comparação com a amostra afluyente aos reatores (redução de 49% e 37%, respectivamente). Enquanto as amostras do reator de fase única apresentaram acréscimo a toxicidade do esgoto sintético (-14%) em comparação ao afluyente (Tabela 31), assim como foi observado nos ensaios de reprodução com a mesma amostra para *C. silvestrii*.

Tabela 31 - Redução da toxicidade das amostras contendo MPOs para os ensaios de toxicidade crônica com *Allonais inaequalis*

Etapa	Estágio	Amostras	Redução da toxicidade (%)
Etapa 2 - Contendo MPOs	Fase única	Reator M1	-14,63
	Fase dupla	Reator Ac	36,85
		Reator M2	48,98

Fonte: Autoria própria (2022).

5.4.4 Impactos ecotoxicológicos

Ensaio de toxicidade crônica são ferramentas necessárias para avaliar o efeito tóxico de contaminantes presentes em baixas concentrações nos ambientes naturais, principalmente por conta da poluição difusa e dos fatores de diluição, estando os organismos aquáticos na maioria das vezes, expostos a doses subletais dos contaminantes (FENT, 2005; ZAGATO; BERTOLETTI, 2014; NEUPARTH et al., 2019). Entretanto, ainda existe uma lacuna acerca da elucidação desses efeitos em organismos bases de cadeia de ambientes aquáticos continentais, sobretudo, quando tratamos de misturas de poluentes e matrizes sanitárias complexas.

Nesse contexto, os invertebrados aquáticos, assim como nos ensaios de toxicidade aguda, apresentaram sensibilidade variada às diferentes etapas do tratamento anaeróbio das amostras. O microcrustáceo *C. silvestrii* foi o organismo mais sensível em todas as exposições crônicas (amostras afluentes, reatores M1 (fase única), Ac e M2 (fase dupla)), apresentando elevadas taxas de inibição da reprodução nas maiores diluições (12,5%). Damasceno de Oliveira et al. (2018), pontuaram variada sensibilidade de *C. silvestrii* em ensaios de toxicidade crônica (CE₅₀ entre 0,03 a 0,89 mg/L), expostos a diferentes produtos farmacêuticos isolados (anti-inflamatórios, antibióticos e anti-hipertensivos), em comparação a organismos Cladocera de regiões temperadas (*Hyaella azteca*, *Daphnia magna*, *Daphnia japonica*). Os autores pontuam, que o Cladocera nativo também apresentou maior sensibilidade aos MPOs, em comparação à outras espécies aquáticas, como o peixe japonês *O. latipes*, as algas *P. subcapitata* e *D. subcapitata*, planta aquática *L. minor*, e a bactéria marinha *V. fischeri*.

Freitas et al. (2018), ao investigar o efeito de antibióticos (oxitetraciclina e florfenicol) isolados e em misturas, observaram que nos ensaios de toxicidade aguda (48h) (concentrações acima de 15 mg/L) houveram variações entre as concentrações de efeito observadas (CE₅₀), com os ensaios de misturas induzindo maior toxicidade letal ao Cladocera *C. silvestrii*, em comparação com os ensaios isolados. Enquanto para os ensaios de toxicidade crônicos (7d), não foram detectadas variações nas concentrações de efeito na reprodução (CE₅₀) da espécie (entre 0,03 e 0,06 mg/L) para os ensaios isolados e as misturas. Nesse caso, apenas a mistura de dois fármacos não induziu acréscimo de toxicidade crônica para *C. silvestrii*, em comparação com as respostas dos ensaios de substâncias isoladas. Os autores pontuam que isso pode ter ocorrido por inúmeros fatores, seja sinergia dos MPOs, fotodegradação, efeitos enzimáticos no organismo, e até dureza da água. Nesta pesquisa, as concentrações nominais em amostras brutas foi de 0,05 mg/L (cada

MPO), próximo às concentrações de efeito observados por Freitas et al. (2018). Entretanto, além da mistura de poluentes, ainda contribuem para a toxicidade os subprodutos da degradação anaeróbia e carga orgânica do esgoto sintético.

Os Oligochaeta *P. longiseta* e *A. inaequalis* apresentaram sensibilidade variada, com o primeiro sendo mais sensível às exposições com as amostras afluente e efluente do reator acidogênico (Ac), e a segunda apresentando maior sensibilidade nas amostras provenientes da fase metanogênica (M1 e M2). Tal fato não foi observado nas exposições agudas, sendo *A. inaequalis* o organismo menos afetado pela toxicidade das amostras nessa etapa. Os organismos bentônicos no geral, tem sido utilizados com sucesso nas últimas décadas em ensaios de letalidade, bioacumulação e reprodução, sendo ótimos indicadores para avaliar efeitos de metais, outros contaminantes inorgânicos, além de poluentes orgânicos dissolvidos e suspensos na água (WARREN et al. 1998; LOBO; ESPÍNDOLA, 2014; CORBI et al., 2015; CASTRO et al., 2022a; CASTRO et al., 2022b). Entretanto, não existe tanto material bibliográfico acerca dos efeitos tóxicos crônicos para os Oligochaeta estudados nesta pesquisa.

Pinheiro (2021), ao avaliar a eficiência de Reatores Anaeróbios de Leito Fluidificado (RALF) na redução da toxicidade de esgoto doméstico (DQO média de 218 mg/L), contendo os anti-inflamatórios diclofenaco (100 µg/L afluente ao reator) e ibuprofeno (150 µg/L afluente ao reator), observou após o tratamento, resultados de toxicidade aguda (CE₅₀) para os bentônicos *A. inaequalis* e *P. longiseta* de 14,6 e 22,5% (TDH de 12h), respectivamente. Sendo os resultados da toxicidade aguda observados por Pinheiro (2021) menores que os identificados nos ensaios crônicos realizados nesta pesquisa para as mesmas espécies. Evidentemente, as matrizes sanitárias são totalmente diferentes, já que o esgoto doméstico apresenta uma complexidade extremamente maior que o esgoto sintético. Entretanto, a autora pontuou que mesmo variando os TDH, a eficiência dos reatores de leito fluidificado foi baixa quanto à redução da toxicidade das amostras reais contendo os fármacos (até 13%). Podendo nesse caso, ser um parâmetro de comparação entre os tipos de reatores e sua eficiência na redução da toxicidade, já que o reator de leito fluidificado tem o biofilme suspenso a partir de um meio inerte (areia, por exemplo), e os reatores de leito fixo tem a biomassa aderida a um material suporte estruturado (espumas de polietileno, por exemplo). Sendo uma das maiores vantagens do reator de leito fixo, a possibilidade de manter altos TDHs, retendo a biota microbiana nos reatores (MOCKAITIS et al., 2014).

De outra forma, Felipe (2019), ao estudar o efeito do MPO Linear Alquil Benzeno Sulfonato de Sódio (presente em detergentes), de forma isolada, e em misturas de esgoto doméstico também tratado por Reator de Leito Fluidificado (RALF), identificou inibição total na reprodução de *A. inaequalis* e desenvolvimento de *C. santicaroli*, para as amostras efluente ao reator (100%). Entretanto, o autor pontua que ao avaliar o efeito da substância isolada em *C. santicaroli*, não foram detectados efeitos crônicos (diluições até 2,8 mg/L), mas para as exposições das amostras efluente aos reatores contendo a mesma concentração do contaminante, houve inibição do desenvolvimento corporal (diluição de 20%). Nesse caso, a mistura complexa dos contaminantes presentes na amostra desencadearam efeitos adversos, como também foi observado para os *Oligochaeta* nesta pesquisa. Além disso, Carneiro et al. (2019), não detectaram efeitos crônicos em ensaios de sobrevivência com *C. santicaroli* expostos ao efluente do Reator de Leito Estruturado enriquecido com antibióticos (40 µg/L), mas identificaram efeitos na emergência de adultos (crônicos de longa duração).

Embora o *C. santicaroli* seja um organismo mais resistente a uma gama de MPOs que as espécies aqui estudadas, alguns autores pontuaram efeitos tóxicos identificados em ensaios crônicos de longa duração com MPOs. Pinheiro (2021), por exemplo, não observou efeitos na sobrevivência da espécie exposta ao efluente do RALF enriquecido com anti-inflamatórios, mas detectou alterações no comprimento larval e no mento (dentes faltando, sobrando e desgastados) nas maiores diluições do efluente (6 e 12%). Nesse caso, é importante ressaltar a necessidade da investigação de outros *endpoints* de efeitos crônicos (alterações enzimáticas, comportamento e outros), pois mesmo que os contaminantes não desencadeiem efeitos mais comumente investigados, podem haver outras alterações que comprometam a qualidade de vida das espécies, como observado com *C. santicaroli*.

Dessa forma, embora os Reatores Anaeróbios de Leito Estruturado, tenham sido eficientes na redução da toxicidade aguda e crônica nos invertebrados aquáticos, com as amostras provenientes da etapa final do reator de fase dupla (M2), apresentando majoritariamente as maiores reduções, o tratamento não foi suficiente para remover completamente a toxicidade (em amostras brutas - 100%). A resolução CONAMA 430, no art. 23, indica que “esgotos sanitários poderão ser objeto de teste de ecotoxicidade no caso de interferência de efluentes com características potencialmente tóxicas ao corpo receptor, a critério do órgão ambiental competente.” (BRASIL,

2011). A mesma resolução ao tratar do lançamento de efluentes em corpos receptores, aponta que para águas de classes I e II, só poderão ser lançados concentrações iguais ou menores ao CENO (no caso da toxicidade crônica), levando em consideração as vazões do corpo receptor e da ETE. Já em águas de classe III, a concentração permitida para lançamentos é $CL_{50}/3$ (para toxicidade aguda). Para as amostras provenientes dos Reatores de Leixo Estruturado estudadas nesta pesquisa, poderiam ser indicadas a realização de um processo de pós-tratamento, a fim de reduzir a toxicidade das amostras brutas (100%), principalmente quando tratamos das respostas crônicas em invertebrados.

6. CONCLUSÕES

- Na etapa sem MPOs, para as exposições de toxicidade aguda *P. longiseta* (CL₅₀ em diluições menores que 31%) foi o organismo mais afetado pela carga orgânica e subprodutos presentes nas amostras, seguido de *C. silvestrii* (CE₅₀ em diluições menores que 41%) e *A. inaequalis* (CL₅₀ em diluições menores que 59%). Entretanto, nos ensaios de toxicidade crônica, a carga orgânica e subprodutos não afetaram tanto a reprodução dos Oligochaeta quanto inibiu a reprodução do Cladocera *C. silvestrii* (CE₅₀ em diluições menores que 12%). *A. inaequalis* foi o organismo mais resistente em todos os ensaios da etapa 1;
- Também foram observados mecanismos de fuga de *A. inaequalis* do ambiente aquático contaminado, nas maiores diluições (25% e 50%) de esgoto tratado (com e sem MPOs). Indicando que por ser um organismo bentônico de vida livre, vivendo em zonas variadas do ambiente aquático (tanto no sedimento quanto na coluna d'água), a espécie pode ser estar menos suscetível a fontes de poluição pontual;
- Para os resultados da etapa com MPOs, as respostas dos ensaios de toxicidade aguda indicaram que *C. silvestrii* foi no geral o organismo mais sensível a todas as exposições (CE₅₀ entre 15,66% e 25,64%), seguido de *P. longiseta* (CL₅₀ entre 15,66% e 37,03%) e *A. inaequalis* (CL₅₀ entre 25,61% e 53,70%). Evidenciando que a inserção dos MPOs aumentou a toxicidade das amostras, principalmente do Cladocera filtrador;
- *Ceriodaphnia silvestrii* foi o organismo mais sensível à todas as exposições de toxicidade crônica (CE₅₀ entre 1,33% e 5,96%). Ilustrando que até em pequenas frações da amostra houve severos efeitos na reprodução do microcrustáceo. Por outro lado, *P. longiseta* foi o organismo com menores inibições na reprodução nos ensaios de toxicidade crônica (CE₅₀ entre 10,49% e 31,82%), seguido de *A. inaequalis* (CE₅₀ entre 10,66% e 23,95%);
- O tratamento anaeróbico do esgoto sintético (contendo MPOs) nos Reatores de Leito Estruturado, apresentaram elevada eficiência na redução da toxicidade aguda, principalmente para os organismos bentônicos, com redução média no reator de fase única (M1) de 52,1%, e 71,9% para amostra do reator de fase dupla (M2). Para o microcrustáceo a redução no M1 foi de 34,2%, e 59,8% no M2. Já nas exposições crônicas, as amostras provenientes do reator de fase única (M1) acarretaram em acréscimo da toxicidade para *C.*

silvestrii e *A. inaequalis* (-64% e -14%, respectivamente), havendo nesse caso, a possibilidade da geração de subprodutos mais tóxicos nesta etapa do tratamento.

6.1 Perspectivas Futuras

- Investigar a contribuição da mistura de MPOs em amostras aquosas na toxicidade aguda e crônica dos invertebrados aquáticos, além da contribuição de subprodutos na toxicidade;
- Realizar ensaios com o lodo proveniente dos Reatores Anaeróbios em exposições de toxicidade com os organismos bentônicos;
- Analisar mecanismos de reprodução assexuada dos Oligochaeta, visando identificar processos de inibição da formação de zonas de fissão e regeneração celular;
- Avaliar a contribuição dos compostos nitrogenados na toxicidade de amostras sanitárias em invertebrados aquáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 12648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**. ABNT, Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. ABNT, Rio de Janeiro: ABNT, 2022.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 13373 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 13373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae)**. ABNT, Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15308: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Misídeos* (Crustacea)**. ABNT, Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15469: Ecotoxicologia - Coleta, preservação e preparo de amostras**. ABNT, Rio de Janeiro: ABNT, 2021.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15470: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda e crônica - Método de ensaio com *Hyaella* spp (Amphipoda) em sedimentos**. ABNT, Rio de Janeiro: ABNT, 2021.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15499: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes**. ABNT, Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

ABREU, MJ. et al. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, 1, p. 121–124, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842010000100016>

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). Atlas esgotos: atualização da base de dados de estações de tratamento de esgotos no Brasil. Agência Nacional de Águas. - Brasília: ANA, p. 44, 2020.

AGUNBIADE, F. O.; MOODLEY, B. Pharmaceuticals as emerging organic contaminants in Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, 11, p. 7273–7291, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3926-z>

AL-HALASEH, L. K. et al. Implication of parabens in cosmetics and cosmeceuticals: Advantages and limitations. **Journal of Cosmetic Dermatology**, p. jocd.14775, 2022. <https://doi.org/10.1111/jocd.14775>

ALVES, R. DA G.; MARCHESE, M. R.; ESCARPINATI, S. C. Oligochaeta (Annelida, Clitellata) in lotic environments in the state of São Paulo, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 96, 4, p. 431–435, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212006000400007>

ALVES, R. DA G.; MARCHESE, M. R.; MARTINS, R. T. Oligochaeta (Annelida, Clitellata) of lotic environments at Parque Estadual Intervales (São Paulo, Brazil). **Biota Neotropica**, v. 8, p. 69–72, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032008000100009>

AMBRÓSIO, A.F. et al. Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. **Neurochem Res.**, 27, p. 121–130, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1014814924965>

AMÉRICO, J. H. P. et al. Ocorrência, destino e potenciais impactos dos fármacos no ambiente. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, p. 59-72, 2013. ISSN 1980-0002.

ANTONIOU, N. A.; ZORPAS A. A. Quality protocol and procedure development to define end-of-waste criteria for tire pyrolysis oil in the framework of circular economy strategy. **Waste Manag.**, v. 95, p. 161-170, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137088>

ANTONUCCI, R. et al. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn. **Curr Drug Metab.**, v. 13, 4, p. 474–490, 2012. <https://doi.org/10.2174/138920012800166607>

ANVISA. **Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico – Quinolonas**. 2017a. Accessed Jan. 21. https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/quinilonas.htm

ANVISA. **Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico - Sulfonamidas**. 2017b. Accessed Jan. 21. https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/sulfonamidas.htm

ARAGÃO, R. B. DE A. et al. Pharmaceutical market, environmental public policies and water quality: the case of the São Paulo Metropolitan Region, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, 11, p. e00192319, 2020. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00192319>

ARVIDSSON, R.; HANSEN, S. F.; BAUN, A. Influence of natural organic matter on the aquatic ecotoxicity of engineered nanoparticles: Recommendations for environmental risk assessment. **NanoImpact**, v. 20, p. 100263, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100263>

ASGHAR, M. A. et al. Suspect screening and target quantification of human pharmaceutical residues in the surface water of Wuhan, China, using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. **Science of The Total Environment**, v. 635, p. 828–837, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.179>

AYOUB, S. S. Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. **Temperature**, v. 8, 4, p. 351–371, 2021. <https://doi.org/10.1080/23328940.2021.1886392>

BAHLMANN, A. et al. Monitoring carbamazepine in surface and wastewaters by an immunoassay based on a monoclonal antibody. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 6, p. 1809–1820, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2958-7>

BAKRIS, G. L.; HART, P.; RITZ, E. Beta blockers in the management of chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 70, 11, p. 1905–1913, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001835>

BEEK A. D. T. et al. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives: Pharmaceuticals in the global environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, 4, p. 823–835, 2016. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>

BELL K.; TWIGGS J.; OLIN B. R. Hypertension: The Silent Killer: Updated JNC-8 Guideline Recommendations. **Alabama Pharmacy Association**, Montgomery, Ala, USA, 2015.

BEREKETOGLU, C.; PRADHAN, A. Comparative transcriptional analysis of methylparaben and propylparaben in zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 671, p. 129–139, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.358>

BERNEGOSSI, A. C. et. al. Coleta, aclimação e manutenção laboratorial de invertebrados aquáticos. In: CORBI, J. J. et. al. (Eds.). **Indicadores biológicos de qualidade em ambientes aquáticos continentais: métricas e recortes para análises**. Belém: RFB Editora, v. 1, p. 14-234, 2021. <https://doi.org/10.46898/rfb.9786558891321.1>

BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. **Série Manuais**. São Paulo: CETESB, 2008.

BEYDOUN, A. et al. Current role of carbamazepine and oxcarbazepine in the management of epilepsy. **Seizure**, v. 83, p. 251–263, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.10.018>

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quím. Nova**, v. 30, p. 651-666, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Quím. Nova**, vol.26, p.523-530, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**, v. 66, 210, p. 78–95, 2018. <https://doi.org/10.4322/dae.2018.009>

BJARNASON, I. et al. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. **Gastroenterology**, v. 104, 6, p. 1832–1847, 1993. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90667-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90667-2)

BŁĘDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WĄSOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. **Environment International**, v. 67, p. 27–42, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>

BLEUMINK, G. S. et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Heart Failure: **Drugs**, v. 63, 6, p. 525–534, 2003. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363060-00001>

BÖGER, B. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, article 123448, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123448>

BOLUJOKO, N. B. et al. Toxicity and removal of parabens from water: A critical review. **Science of The Total Environment**, v. 792, p. 148092, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148092>

BOTTONI, P. S. et al. Pharmaceuticals as priority water contaminants. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 92:3, p. 549-565, 2010. <https://doi.org/10.1080/02772241003614320>

BOYD, C. E. Total Hardness. In: BOYD, C. E. (Ed.). **Water Quality**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 179–187. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17446-4_9

BUNKE, D. et al. Developments in society and implications for emerging pollutants in the aquatic environment. **Environ Sci Eur.**, v. 31, article 32, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0213-1>

CALDAS, S. et al. Occurrence of Pesticides and PPCPs in Surface and Drinking Water in Southern Brazil: Data on 4-Year Monitoring. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, 1, p. 71–80, 2018. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180154>

CARDOSO, M. Antimicrobial use, resistance and economic benefits and costs to livestock producers in Brazil. **OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers**, v. 135. <https://doi.org/10.1787/27137b1e-en>

CARMONA, E.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. **Science of The Total Environment**, v. 484, p. 53–63, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.085>

CARNEIRO, R. B. **Avaliação do desempenho de biorreatores anaeróbios de leito fixo ordenado e empacotado para remoção dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, p. 248, São Carlos, 2019. <https://doi.org/10.11606/T.18.2020.tde-04052020-172133>

CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558–564, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.006>

CASTRO, G. B. et al. Is the development of *Daphnia magna* neonates affected by short-term exposure to polyethylene microplastics?. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 55, p. 935-946, 2020a. <https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1756656>

CASTRO, G. B. et al. Polyethylene microplastics and substrate availability can affect emergence responses of the freshwater insect *Chironomus sancticaroli*. **Ecotoxicology**, 2022a. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02536-4>

CASTRO, G. B. et al. The silent harm of polyethylene microplastics: Invertebrates growth inhibition as a warning of the microplastic pollution in continental waters. **Limnologia**, v. 93, p. 125964, 2022b. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2022.125964>

CASTRO, G. B. et al. Update on the use of *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, 30, p. 38360–38369, 2020b. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10295-0>

CASTRO, P. L. P. **Farmacocinética do paracetamol**. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, p.97, 2014.

CETESB-COMPANHIA, DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO. Manual de Controle Ecotoxicológico de Efluentes Líquidos - **São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente**, 2ª ed., 44 p., 2013

CETESB-COMPANHIA, DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO. AMBIENTAL. Relatório de qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo. **Apêndice D. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente**, 2008.

CHANG, X. et al. Potential health impact of environmental micro- and nanoplastics pollution. **Journal Appl. Toxicol.**, v. 40, p. 4-15, 2020. <https://doi.org/10.1002/jat.3915>

CHAPMAN, P. M.; FARRELL, M. A.; BRINKHURST, R. O. Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 2, 1, p. 47–67, 1982. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(82\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(82)90005-4)

CHAUMOT, A. et al. Ecotoxicology, Aquatic Invertebrates. Encyclopedia of Toxicology. **Ed. Elsevier**, v. 3, p.284-288, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00498-X>

CHAVES, M. DE J. S. et al. Pharmaceuticals and personal care products in a Brazilian wetland of international importance: Occurrence and environmental risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 734, p. 139374, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139374>

CHEN, Z. et al. High concentration and high dose of disinfectants and antibiotics used during the COVID-19 pandemic threaten human health. **Environmental Sciences Europe**, v. 33, 1, p. 11, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00456-4>

CHENG, K. C. et al. Design and performance optimisation of detergent product containing binary mixture of anionic-nonionic surfactants. **Heliyon**, v. 6, 5, p. e03861, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03861>

CHOW, L. K. M. et al. A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment. **J. Environ. Sci.**, v. 99, p. 21-27, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.05.030>

CHRYSANT, S. G.; CHRYSANT, G. S. Antihypertensive and cardioprotective effects of three generations of beta-adrenergic blockers: an historical perspective. **Hospital Practice**, p. 21548331.2022.2040920, 2022. <https://doi.org/10.1080/21548331.2022.2040920>

COLLADO, R.; SCHMELZ, R. M. *Pristina trifida* sp. nov., a new soil-dwelling microannelid (Oligochaeta: Naididae) from Amazonian Forest soils, with comments on species recognition in the genus. **Zootaxa**, v. 118, 1, p. 1, 2002. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.118.1.1>

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. **Resolução no 357, in: Diário Oficial Da União No053**. Brasil, Brasília, pp. 58–63.

COSTA, et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1820–1830, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>

CRESPI-ABRIL, A.-C.; RUBILAR, T. Moving forward in the ethical consideration of invertebrates in experimentation: Beyond the Three R's Principle. **Revista de Biología Tropical**, v. 69, 1, p. S346–S357, 2021. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69iSuppl.1.46366>

CULLY, M. Public health: The politics of antibiotics. **Nature**, v. 509, p. 16–17, 2014. <https://doi.org/10.1038/509S16a>

CUNNINGHAM, V. L. et al. Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 343–351, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.10.006>

DAGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, 3, p. 209–227, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>

DALLA BONA, M. et al. Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 152–158, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.018>

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2011. v. 1. 317p

DAMASCENO DE OLIVEIRA, L. L. et al. Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, p. 116, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3765-6>

DAMBAL, V. Y. et al. Developmental toxicity and induction of vitellogenin in embryolarval stages of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to methyl Paraben. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 113–118, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.048>

DARBRE, P. D.; HARVEY, P. W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, 5, p. 561–578, 2008. <https://doi.org/10.1002/jat.1358>

DARBRE, P. D.; HARVEY, P. W. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status: Parabens and breast cancer. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, 9, p. 925–938, 2014. <https://doi.org/10.1002/jat.3027>

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLÉ, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, 6, p. 442–448, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, 6–7, p. 641–646, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2004.04.002>

DERISSO, C. R. et al. Occurrence of Parabens in Surface Water, Wastewater Treatment Plant in Southeast of Brazil and Assessment of Their Environmental Risk. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, 9, p. 468, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04835-0>

DERMAN, W.; SCHWELLNUS, M. Beta-blockers and physical exercise. **The Journal of Modern Pharmacy**, vol. 5, 1, p. 12, 1998.

DHAKAM, Z. et al. Atenolol and Eprosartan: Differential Effects on Central Blood Pressure and Aortic Pulse Wave Velocity. **American Journal of Hypertension**, v. 19, 2, p. 214–219, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2005.08.007>

DIETRICH, S. et al. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. **Chemosphere**, v. 79, 1, p. 60–66, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.069>

DOMINGUES, D.F., BERTOLETTI, E., 2008. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos, in: Zagatto, P.A., Bertolotti, E. (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. RiMa, São Carlos, 153–18.

DU, J. et al. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, 1, p. 84–90, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1806-7>

DUAN, X. et al. Simultaneous enhancement of nonylphenol biodegradation and short-chain fatty acids production in waste activated sludge under acidogenic conditions. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 24–31, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.165>

DURÁN-ÁLVAREZ, J. C. et al. Environmental fate of naproxen, carbamazepine and triclosan in wastewater, surface water and wastewater irrigated soil — Results of laboratory scale experiments. **Science of The Total Environment**, v. 538, p. 350–362, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.028>

EBELE, A. J. et al. Occurrence, seasonal variation and human exposure to pharmaceuticals and personal care products in surface water, groundwater and drinking water in Lagos State, Nigeria. **Emerging Contaminants**, v. 6, p. 124–132, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.02.004>

EBELE, A. J.; ABOU-ELWAFI ABDALLAH, M.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, v. 3, 1, p. 1–16, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>

EBERT, I. et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, 12, p. 2786–2792, 2011. <https://doi.org/10.1002/etc.678>

EFFENDI, I. et al. Detergent Disposal into Our Environment and Its Impact on Marine Microbes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 97, p. 012030, 2017. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/97/1/012030>

ELHAFEEZ, S. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs among chronic kidney disease patients: an epidemiological study. **Journal of the Egyptian Public Health Association**, v. 94, 1, p. 8, 2019. <https://doi.org/10.1186/s42506-018-0005-2>

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. **Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil**. Brasília: Universa, 1997.

ERSÉUS, C. et al. Molecular data reveal a tropical freshwater origin of Naidinae (Annelida, Clitellata, Naididae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 115, p. 115–127, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.016>

ESH, C. J. et al. Pharmacological hypotheses: Is acetaminophen selective in its cyclooxygenase inhibition? **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 9, 4, 2021. <https://doi.org/10.1002/prp2.835>

ETTEHAD, D. et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 387, 10022, p. 957–967, 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01225-8)

European Commission (Ed.) Commission Regulation (EU) No 358/2014 of 9 April 2014 Amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on Cosmetic Products; 358/2014; European Commission: Brussels, Belgium, 2014.

FADL, S. E. et al. Effect of adding Dunaliella algae to fish diet on lead acetate toxicity and gene expression in the liver of Nile tilapia. **Toxin Reviews**, v. 40, 4, p. 1155–1171, 2021. <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1652652>

FAGGIO, C. et al. Cytotoxicity, hemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 258–265, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.010>

FAN, Y. et al. Kinetic and mechanistic investigations of the degradation of sulfamethazine in heat-activated persulfate oxidation process. **J. Hazard Mater.**, v. 300, p. 39-47, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.058>

FELIPE, M. C. et al. The use of an *Allonais inaequalis* reproduction test as an ecotoxicological bioassay. **Ecotoxicology**, v. 29, 5, p. 634–638, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02232-1>

FELIPE, M.C. **Bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em exposição ao Alquilbenzeno Linear Sulfonado**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, p. 215, São Carlos, 2019. <https://doi.org/10.11606/T.18.2019.tde-23052019-162632>

FENT, K.; WESTON, A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>

FERRARI, B. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 3, p. 359–370, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00082-9)

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, 4, p. 319-328, 2004.

FORRÓ, L. et al. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, 1, p. 177–184, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9013-5>

FREDERIKSEN, H.; JØRGENSEN, N.; ANDERSSON, A.-M. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 21, 3, p. 262–271, 2011. <https://doi.org/10.1038/jes.2010.6>

FREITAS, A. M. et al. Ecotoxicity evaluation of a WWTP effluent treated by solar photo-Fenton at neutral pH in a raceway pond reactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, 2, p. 1093–1104, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7101-7>

FREITAS, E. C.; ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 663–672, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.073>

FREITAS, E. C.; ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 663–672, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.073>

FREITAS, L. DE A. A.; RADIS-BAPTISTA, G. Pharmaceutical Pollution and Disposal of Expired, Unused, and Unwanted Medicines in the Brazilian Context. **Journal of Xenobiotics**, v. 11, 2, p. 61–76, 2021. <https://doi.org/10.3390/jox11020005>

FUENTEFRIA, D. B. et al. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related? **J. Environ. Manage.**, v. 92, p. 250–255, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.09.001>

GAD, C. S. Acute and chronic systemic chromium toxicity. **Sci. Tot. Environ.**, v. 86, p. 149–157, 1989. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90201-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90201-5)

GALANI, A. et al. Patterns of pharmaceuticals use during the first wave of COVID-19 pandemic in Athens, Greece as revealed by wastewater-based epidemiology. **Science of The Total Environment**, v. 798, p. 149014, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149014>

GALINARO, C. A. et al. Environmental risk assessment of parabens in surface water from a Brazilian river: the case of Mogi Guaçu Basin, São Paulo State, under precipitation anomalies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, 6, p. 8816–8830, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16315-x>

GARCÍA-MORALES, J. L. et al. Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear alkylbenzene-sulfonate (LAS). **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 15, n. 1, p. 13–20, 2001.

GEBARA, R. C. et al. Resource competition among the Anostraca *Dendrocephalus brasiliensis* and three Neotropical cladocerans: implications on population dynamics and secondary production. **Hydrobiologia**, v. 847, 5, p. 1269–1280, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04181-6>

GOLDEN, R.; GANDY, J.; VOLLMER, G. A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, 5, p. 435–458, 2005. <https://doi.org/10.1080/10408440490920104>

GOMES, D. F. et al. Aquatic oligochaeta (Annelida: Clitellata) in extractive reserve Lake Cuniã, Western Brazilian Amazon. **Biota Neotropica**, v. 17, 1, 2017. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2016-0232>

GONZÁLEZ PEÑA, O. I.; LÓPEZ ZAVALA, M. Á.; CABRAL RUELAS, H. Pharmaceuticals Market, Consumption Trends and Disease Incidence Are Not Driving the Pharmaceutical Research on Water and Wastewater. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, 5, p. 2532, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052532>

GORNI, G. R. et al. Oligochaeta (Annelida: Clitellata) in the Juruena River, MT, Brazil: species indicators of substrate types. **Biota Neotropica**, v. 18, 4, 2018. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2018-0566>

GORNI, G. R.; ALVES, R. DA G. Naididae (Annelida, Oligochaeta) associated with *Pomacea bridgesii* (Reeve) (Gastropoda, Ampullaridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, 4, p. 1059–1061, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752006000400011>

GRAFF, L. et al. Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, 6, p. 1368–1379, 2003. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220625>

GUAIS, A. et al. Toxicity of Carbon Dioxide: A Review. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, 12, p. 2061–2070, 2011. <https://doi.org/10.1021/tx200220r>

GUIMARÃES, D. O. et al. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, p. 667–679, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

GUIMARAES, D. O. et al. Antibiotics therapeutic importance and prospects for the discovery and development of new agents. **New Chemistry**, v. 33, p. 667-679, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

GWENZI, W. et al. COVID-19 drugs in aquatic systems: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 20, 2, p. 1275–1294, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01356-y>

HAN, S. et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 3, p. 256–264, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.013>

HARMAN, W. J.; BRINKHURST, R. O.; MARCHESE, M. A contribution to the taxonomy of the aquatic Oligochaeta (Naididae) of South America. **Canadian Journal of Zoology**, v. 66, 10, p. 2233–2242, 1988. <https://doi.org/10.1139/z88-331>

HEYE, K. et al. Ecotoxicological characterization of the antiepileptic drug carbamazepine using eight aquatic species: baseline study for future higher tier tests. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 54, n. 5, p. 441–451, 2019. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1562819>

HODGMAN, M. J.; GARRARD, A. R. A Review of Acetaminophen Poisoning. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 4, p. 499–516, out. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.006>

HOWARD, S. R.; SYMONDS, M. R. E. Ethical considerations for invertebrates. **Animal Sentience**, v. 5, 29, 2020. <https://doi.org/10.51291/2377-7478.1608>

HUANG, Da-Ji; HOU, Jung-Hsin; KUO, Tzong-Fu; et al. Toxicity of the veterinary sulfonamide antibiotic sulfamonomethoxine to five aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 874–880, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.09.006>

HUGGETT, D. B. et al. Toxicity of Select Beta Adrenergic Receptor-Blocking Pharmaceuticals (B-Blockers) on Aquatic Organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, 2, p. 229–235, 2002. <https://doi.org/10.4491/eer.2016.115>

INTERFARMA - The Association of the Pharmaceutical Research Industry. Guide 2020 (Guia INTERFARMA 2020). Interfarma, USA, p. 41, 2020.

ISIDORI, M. et al. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. **Science of The Total Environment**, v. 348, 1–3, p. 93–101, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.068>

ISLAM, M. R. Sample size and its role in Central Limit Theorem (CLT). **International Journal of Physics & Mathematics**, v. 4, 1, p. 1-7 2018. <https://doi.org/10.31295/ijpm.v1n1.42>

IWASAKI, Y. et al. Does the Choice of NOEC or EC10 Affect the Hazardous Concentration for 5% of the Species? **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 15, p. 9326–9330, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02069>

JACONETTI, P. C. M. **Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii***. Dissertação (Mestrado em Ciências – Tecnologia Nuclear) – Instituto De Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Univeridade de São Paulo (USP). São Paulo, p. 206, 2005.

JOHANSSON, C. H.; JANMAR, L.; BACKHAUS, T. Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 248–258, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.015>

JOHNSON, P. et al. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102340, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>

KANASE, Y. et al. 4-Substituted carbamazepine derivatives: Conformational analysis and sodium channel-blocking properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 2508–2513, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.013>

KANAUIYA, D. K. et al. Biological Treatment Processes for the Removal of Organic Micropollutants from Wastewater: a Review. *Current Pollution Reports*, v. 5, 3, p. 112–128, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40726-019-00110-x>

KARUTHAPANDI, M.; RAO, D. V. Cladoceran Diversity, Distribution and Ecological Significance. In: CHAKRAVARTHY, A. K.; SRIDHARA, S. (Eds.). **Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-tropics**. Singapore: Springer Singapore, p. 183–196, 2016. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1518-2_11

KHALID, A. et al. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, v. 31, n. 8, p. 1737–1744, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>

KIM, H. et al. Acute toxicity and antioxidant responses in the water flea *Daphnia magna* to xenobiotics (cadmium, lead, mercury, bisphenol A, and 4-nonylphenol). **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 9, 1, p. 41–49, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13530-017-0302-8>

KIM, H.-J. et al. Determination of toxic effects of lead acetate on different sizes of zebra fish (*Danio rerio*) in soft and hard water. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, 2, p. 1390–1394, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.032>

KIM, J.; CHEVRIER, J. Exposure to parabens and prevalence of obesity and metabolic syndrome: An analysis of the Canadian Health Measures Survey. **Science of The Total Environment**, v. 713, p. 135116, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135116>

KIM, M.-K.; ZOH, K.-D. Occurrence and removals of micropollutants in water environment. **Environmental Engineering Research**, v. 21, 4, p. 319–332, 2016. <https://doi.org/10.4491/eer.2016.115>

KITAMURA, R. S. A. et al. Sublethal biochemical, histopathological and genotoxicological effects of short-term exposure to ciprofloxacin in catfish *Rhamdia quelen*. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118935, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118935>

KLEIN, E. Y. et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 115 (15), p. 3463–3470, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>

KONSCHAK, M. et al. The importance of diet-related effects of the antibiotic ciprofloxacin on the leaf-shredding invertebrate *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda). **Aquatic Toxicology**, v. 222, p. 105461, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105461>

KUMAR, M. et al. Antidrug resistance in the Indian ambient waters of Ahmedabad during the COVID-19 pandemic. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 126125, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126125>

KUNG, T. A. et al. Survey of selected personal care products in surface water of coral reefs in Kenting National Park, Taiwan. **Science of The Total Environment**, v. 635, p. 1302–1307, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.115>

KURODA, K. et al. Predicted occurrence, ecotoxicological risk and environmentally acquired resistance of antiviral drugs associated with COVID-19 in environmental waters. **Science of The Total Environment**, v. 776, p. 145740, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145740>

LASKOWSKI, R. Some Good Reasons to Ban the Use of NOEC, LOEC and Related Concepts in Ecotoxicology. **Oikos**, v. 73, n. 1, p. 140, 1995. <https://doi.org/10.2307/3545738>

LEE, J. et al. Phototoxicity and chronic toxicity of methyl paraben and 1,2-hexanediol in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 26, 81–89, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1743-6>

LEITE, L. DE S. et al. Acute toxicity of disinfection by-products from chlorination of algal organic matter to the cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*: influence of bromide and quenching agent. **Environmental Science and Pollution Research**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18752-8>

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, 1, p. 3–28, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00872193>

LI, Q. et al. Acute toxicity and histopathological effects of naproxen in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, 18, p. 18832–18841, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7092-4>

LI, Z. et al. Antibiotics in Aquatic Environments of China: A Review and Meta-analysis. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 199, p. 1090–1242, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110668>

LIBRALATO, G. et al. Influence of storage methods, refrigeration or freezing, on the toxicity of wastewater samples to oyster embryos. **Environmental Technology**, v. 30, 6, p. 535–541, 2009. <https://doi.org/10.1080/09593330902831226>

LIMA GOMES, P. C. F. et al. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, 29, p. 8787–8801, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9038-y>

LIN, L. et al. Post COVID-19 pandemic: Disposable face masks as a potential vector of antibiotics in freshwater and seawater. **Science of The Total Environment**, v. 820, p. 153049, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153049>

LINCHO, J.; MARTINS, R. C.; GOMES, J. Paraben Compounds—Part I: An Overview of Their Characteristics, Detection, and Impacts. **Applied Sciences**, v. 11, 5, p. 2307, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11052307>

LIU, L. et al. Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. **Acta Ecol. Sin.**, v. 38, p. 36-4, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.01.006>

LOCK, K.; JANSSEN, C. R. Effect of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*. **Chemosphere**, v. 44, 8, p. 1669–1672, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00565-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00565-8)

LUCAS, G. N. C. et al. Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, n. 1, p. 124–130, mar. 2019. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2018-0107>

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

MADIKIZELA, L. M.; MDLULI, P. S.; & CHIMUKA, L. An initial assessment of naproxen, ibuprofen and diclofenac in Ladysmith water resources in South Africa using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography-photodiode array detection. **South African journal of chemistry**, v. 70, p. 145-153, 2017. <http://dx.doi.org/10.17159/0379-4350/2017/v70a21>

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S.; A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Bras.**, v. 12, p. 355–381, 2008. ISSN: 1980-6442

MAJEWSKY, M. et al. Antibacterial Activity of Sulfamethoxazole Transformation Products (TPs): General Relevance for Sulfonamide TPs Modified at the para-Position. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 27, 1821–1828, 2014. <https://doi.org/10.1021/tx500267x>

MANSANO, A. S. et al. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, 14, p. 13335–13346, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8274-9>

MANSANO, A. S. et al. Individual and mixture toxicity of carbofuran and diuron to the protozoan *Paramecium caudatum* and the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110829, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110829>

MARTINS, G. S. et al. Removal of sulfamethoxazol and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9, 4, p. 253–264, 2017. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2017.020>

MASHILE, G. P. et al. Recyclable magnetic waste tyre activated carbon-chitosan composite as an effective adsorbent rapid and simultaneous removal of methylparaben and propylparaben from aqueous solution and wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, p. 101011, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101011>

MATTSON, V. R. et al. Effects of low dissolved oxygen on organisms used in freshwater sediment toxicity tests. **Chemosphere**, v. 70, 10, p. 1840–1844, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.006>

MATWIEJCZUK, N.; GALICKA, A.; BRZÓSKA, M. M. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, 1, p. 176–210, 2020. <https://doi.org/10.1002/jat.3917>

MCAINSH, J.; CRUICKSHANK, J. M. Beta-blockers and central nervous system side effects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, 2, p. 163–197, 1990. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90092-G](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90092-G)

MEHRJOO, H.; RIAZI, M.; NOROUZI-APOURVARI, S. A comprehensive review on the use of eco-friendly surfactants in oil industry. **Chemical Methods: Enhanced Oil Recovery Series**, Elsevier, p. 357–399, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821931-7.00009-2>

MEHVAR, R.; BROCKS D. R. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques**, vol. 4, 2, p. 185-200, 2001.

MIGLIORE, L. et al. Toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia. **Water Res.**, v. 31, p.1801– 1806, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00412-5)

MOERMOND, C. T. A.; SMIT, C. E. Derivation of water quality standards for carbamazepine, metoprolol, and metformin and comparison with monitoring data: Environmental risk limits for pharmaceuticals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, 4, p. 882–888, 2016. <https://doi.org/10.1002/etc.3178>

MONTAGNER, C. C. et al. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Quím. Nova**, v. 40, p. 1094-1110, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>

MORENO RÍOS, A. L. et al. Pharmaceuticals as emerging pollutants: Case naproxen an overview. **Chemosphere**, v. 291, p. 132822, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132822>

NALIATO, D. A. DE O. **Diversidade da Cladocera (Crustacea, Anomopoda e Ctenopoda) em reservatórios e trechos lóticos da bacia do Rio Prata (Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai)**. Tese (Doutorado - Ciências Biológicas) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, p. 96 f., 2013. <http://hdl.handle.net/11449/108446>

NANDINI, S. et al. The ability of selected cladoceran species to utilize domestic wastewaters in Mexico City. **Journal of Environmental Management**, v. 71, 1, p. 59–65, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.001>

NEVES E CASTRO, P. B. et al. Antibiotic consumption in developing countries defies global commitments: an overview on Brazilian growth in consumption. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 27, p. 21013–21020, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08574-x>

NOWAK, K.; JABŁOŃSKA, E.; RATAJCZAK-WRONA, W. Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products. **Environmental Research**, v. 198, p. 110488, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110488>

OECD (2008), Test No. 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264067516-en>

OECD. Health at a Glance 2019: OECD Indicators. [s.l.] OECD, 2019. <https://doi.org/10.1787/4dd50c09-en>

OGUEJI, E. et al. Acute toxicity effects of ibuprofen on behaviour and haematological parameters of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **African Journal of Aquatic Science**, v. 43, 3, p. 293–303, 2018. <https://doi.org/10.2989/16085914.2018.1465393>

OHTAKA, A. Aquatic oligochaete fauna (Annelida, Clitellata) in Lake Tonle Sap and adjacent waters in Cambodia. **Limnology**, v. 19, 3, p. 367–373, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10201-018-0543-5>

OLIVEIRA-FILHO, E. et al. Implications of water hardness in ecotoxicological assessments for water quality regulatory purposes: a case study with the aquatic snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 175–180, 2014. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.24212>

OLKOWSKA, E.; POLKOWSKA, Ż.; NAMIEŚNIK, J. Analytics of Surfactants in the Environment: Problems and Challenges. **Chemical Reviews**, v. 111, 9, p. 5667–5700, 2011. <https://doi.org/10.1021/cr100107g>

OLKOWSKA, E.; RUMAN, M.; POLKOWSKA, Ż. Occurrence of Surface Active Agents in the Environment. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, p. 1–15, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/769708>

ORTIZ DE GARCÍA, S. A. et al. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. **Ecotoxicology**, v. 23, 8, p. 1517–1533, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1293-8>

PAL, A. et al. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environ. Int.**, v. 71, p. 46-62, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.025>

PANARELLI, E. A.; CASANOVA, S. M. C.; HENRY, R. Secondary production and biomass of Cladocera in marginal lakes after the recovery of their hydrologic connectivity in a river–reservoir transition zone. **Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use**, v. 15, 4, p. 319–334, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1770.2010.00444.x>

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environment International**, v. 33, 6, p. 817–822, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.014>

PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 526–538, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>

PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 17, 6, p. 526–538, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>

PAROLINI, M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. **Science of The Total Environment**, v. 740, p. 140043, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140043>

PATHIRATNE, A.; WEERASUNDARA, A. Bioassessment of Selected Inland Water Bodies in Sri Lanka Using Benthic Oligochaetes with Consideration of Temporal Variations. **International Review of Hydrobiology**, v. 89, 3, p. 305–316, 2004. <https://doi.org/10.1002/iroh.200310676>

PEIXOTO, P. S. et al. Fluoroquinolones and sulfonamides: features of their determination in water. a review. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 185-202, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2015.1128539>

PELTZER, P. M. et al. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 114–123, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>

PETEFFI, G. P. et al. Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River Basin - Rio Grande do Sul - Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, 4, p. 712–712, 2019. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.189752>

PINHEIRO, F.R. **Avaliação dos efeitos tóxicos do tratamento de efluente doméstico por reator de leito fluidificado enriquecido com o anti-inflamatório diclofenaco em invertebrados aquáticos**. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, p. 147, São Carlos, 2021. <https://doi.org/10.11606/D.18.2021.tde-28012022-172437>

PINHEIRO, R. M.; WANNMACHER, L. Uso Racional de Anti-inflamatórios Não Esteroides. In: Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde, organizador. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. Brasília: Editora MS; p. 41-50, 2012.

PISHARODY, L. et al. Occurrence of organic micropollutants in municipal landfill leachate and its effective treatment by advanced oxidation processes. **Chemosphere**, v. 287, p. 132216, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132216>

PLAA, G.L. Present status: toxic substances in the environment. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p. 1010 – 1016, 1982. <https://doi.org/10.1139/y82-145>

POLLI, G. M.; KUHNEN, A. Possibilidades de uso da teoria das representações sociais para os estudos pessoa-ambiente. **Estud. psicol. (Natal)**, v.16, p.57-64, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-294X2011000100008>

POLLO, S.; VITALE, A. Invertebrates and Humans: Science, Ethics, and Policy. In: CARERE, C.; MATHER, J. (Eds.). **The Welfare of Invertebrate Animals**. Cham: Springer International Publishing, v. 18, p. 7–22, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13947-6_2

POMPEI, C. M. E. et al. Occurrence of PPCPs in a Brazilian water reservoir and their removal efficiency by ecological filtration. **Chemosphere**, v. 226, p. 210–219, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.122>

PRICHARD, E.; GRANEEK, E. F. Effects of pharmaceuticals and personal care products on marine organisms: from single-species studies to an ecosystem-based approach. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 23, p. 22365-22384, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7282-0>

RAFIA, R.; ASHOK, K. P. Macroinvertebrates (oligochaetes) as indicators of pollution: A review. **Journal of Ecology and The Natural Environment**, v. 6, 4, p. 140–144, 2014. <https://doi.org/10.5897/JENE2014.0443>

RAINSFORD, K. D. Anti-Inflammatory Drugs in the 21st Century. In: HARRIS, R. E. et al. (Eds.). **Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. v. 42p. 3–27. https://doi.org/10.1007/1-4020-5688-5_1

RAM, C. V. S. Beta-Blockers in Hypertension. **The American Journal of Cardiology**, v. 106, 12, p. 1819–1825, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.08.023>

RAMÍREZ-MORALES, D. et al. Pharmaceuticals in farms and surrounding surface water bodies: Hazard and ecotoxicity in a swine production area in Costa Rica. **Chemosphere**, v. 272, p. 129574, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129574>

Rand, G.M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, 1995, 2nd ed. Washington.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, 1–12, p. 17–23, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)

RATHORE, R.S.; KHANGAROT, B.S. Effects of Water Hardness and Metal Concentration on a Freshwater *Tubifex Tubifex Muller*. **Water, Air, & Soil Pollution**, 142, 341–356, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1022016021081>

RAWSON, T. M. et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals with Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, 9, p. 2459–2468, 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530>

REGISTRY-MIGRATION.GBIF.ORG. GBIF Backbone **Taxonomy GBIF Secretariat**, 2021. Disponível em: <https://www.gbif.org/dataset/d7dddbf4-2cf0-4f39-9b2a-bb099caae36c>

RIBEIRO, R. N. DE F.; MARTINS, W. DE A.; RIBEIRO, B. N. DE F. Rare Case of Hypertensive Crisis Secondary to Diencephalic Epilepsy. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, p. 95–97, 2017. <http://dx.doi.org/10.5935/2359-4802.20170016>

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 546-582, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04493>

ROCHA, O. et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, v. 27, 7, p. 834–844, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1921-9>

ROCHA, O.; SANTOS-WISNIEWSKI, M. J.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Checklist de Cladocera de água doce do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, suppl 1, p. 571–592, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000500024>

ROJO, M. et al. Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental Pollution*, v. 252, p. 146–154, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.099>

ROSNER, A. et al. Stem cells of aquatic invertebrates as an advanced tool for assessing ecotoxicological impacts. **Sci. Total Environ.**, v. 771, 144565, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144565>

ROSNER, A. et al. Stem cells of aquatic invertebrates as an advanced tool for assessing ecotoxicological impacts. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144565, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144565>

SÁ, M. P. B. O. et. al. Risco de hipotensão arterial em idosos em uso de medicação anti-hipertensivas em acompanhamento clínico adequado. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, vol. 7, 5, p. 290-294. 2009.

SANCHES, N. A. DE O. et al. Inventário de oligochaeta (annelida: clitellata) em córregos urbanos de bocaina – SP, Brasil. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 19, 1, p. 14, 2016. <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2016.v19i1.364>

SANCHES, N. A. DE O. et al. Oligochaeta (Annelida: Clitellata) associated to aquatic macrophytes in Brazil. **Biotemas**, v. 29, 3, p. 1, 2016. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2016v29n3p1>

SANTOS, M. M. et al. Antimicrobial Activities of Highly Bioavailable Organic Salts and Ionic Liquids from Fluoroquinolones. **Pharmaceutics**, v. 12, article 694, 2020. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080694>

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. The Anti-Inflammatory Effects of Prostaglandins. **Journal of Investigative Medicine**, v. 57, 6, p. 703–708, 2009. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31819aaa76>

SCHRÖR, K. Aspirin and Reye Syndrome: A Review of the Evidence. **Pediatric Drugs**, v. 9, 3, p. 195–204, 2007. <https://doi.org/10.2165/00148581-200709030-00008>

SCIENCE DIVISION, DEPARTMENT OF ENVIRONMENT AND CONSERVATION; PINDER, A. Tools for identifying selected Australian aquatic oligochaetes (Clitellata: Annelida). **Museum Victoria Science Reports**, v. 13, p. 1–26, 2010. <https://doi.org/10.24199/j.mvsr.2010.13>

SEITZ, S. Pixilated partnerships, overcoming obstacles in qualitative interviews via Skype: a research note. **Qualitative Research**, v. 16, n. 2, p. 229–235, 2016. <https://doi.org/10.1177/1468794115577011>

SERNA-GALVIS, E. A. et al. Degradation of highly consumed fluoroquinolones, penicillins and cephalosporins in distilled water and simulated hospital wastewater by UV254 and UV254/persulfate processes. **Water Res.**, v. 122, p. 128–138, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.065>

SERNA-GALVIS, E. A. et al. Degradation of highly consumed fluoroquinolones, penicillins and cephalosporins in distilled water and simulated hospital wastewater by UV254 and UV254/persulfate processes. **Water Research**, v. 122, p. 128–138, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.065>

SIEMENS, J. et al. Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City–Mezquital Valley. **Water Research**, v. 42, 8–9, p. 2124–2134, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.019>

SILVA, A. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. **Braz J Microbiol**, v. 51, p. 347–356, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00168-1>

SILVA, A. de S.E et al. Fatores que influenciam a produção de ácidos carboxílicos a partir de resíduos agroindustriais. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 5, p. 655–666, out. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1413-4152202020190174>

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p. 155–160, 2000. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>

SMETI, E. M.; KORONAKIS, D. E.; GOLFINOPOULOS, S. K. Control charts for the toxicity of finished water—Modeling the structure of toxicity. **Water Research**, v. 41, 12, p. 2679–2689, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.036>

SNELL, T. W.; JANSSEN, C. R. Rotifers in ecotoxicology: a review. **Hydrobiologia**, v. 313, p. 231–247, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00025956>

SODRÉ, F. F.; DUTRA, P. M.; DOS SANTOS, V. P. Pharmaceuticals and personal care products as emerging micropollutants in Brazilian surface waters: a preliminary snapshot on environmental contamination and risks. **Eclética Química Journal**, v. 43, 1SI, p. 22, 28 2018. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v43.1SI.2018.p22-34>

SOLÉ, M. et al. Estrogenicity Determination in Sewage Treatment Plants and Surface Waters from the Catalanian Area (NE Spain). **Environmental Science & Technology**, v. 34, 24, p. 5076–5083, 2000. <https://doi.org/10.1021/es991335n>

SPADOTO, M. et al. Ecotoxicological effects of bisphenol A and nonylphenol on the freshwater cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, 4, p. 449–458, 2017. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1381109>

SPIGAGLIA, P. Clostridioides difficile infection (CDI) during the COVID-19 pandemic. **Anaerobe**, p. 102518, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102518>

SPONGBERG, A. L. et al. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. **Water Research**, v. 45, 20, p. 6709–6717, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.004>

STEVENS, D. L. Could Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs) Enhance the Progression of Bacterial Infections to Toxic Shock Syndrome? **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, 4, p. 977–980, 1995. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.4.977>

SUN, Q. et al. PPCPs in Jiulong River estuary (China): Spatiotemporal distributions, fate, and their use as chemical markers of wastewater. *Chemosphere*, v. 150, p. 596–604, maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.036>

SUZUKI, S.; HOA, P. T. P. Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina. *Front. Microbio.*, v. 13, article 67, 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00067>

SZÖCS, E.; SCHÄFER, R. B. Ecotoxicology is not normal: A comparison of statistical approaches for analysis of count and proportion data in ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, 18, p. 13990–13999, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4579-3>

TAFRESHI, M. J.; WEINACKER, A. B. β -Adrenergic-Blocking Agents in Bronchospastic Diseases: A Therapeutic Dilemma. *Pharmacotherapy*, v. 19, 8, p. 974–978, 1999. <https://doi.org/10.1592/phco.19.11.974.31575>

TAVARES, R. S. et al. Parabens in male infertility—Is there a mitochondrial connection? *Reproductive Toxicology*, v. 27, 1, p. 1–7, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.10.002>

TERASAKI, M. et al. Chronic toxicity of parabens and their chlorinated by-products in *Ceriodaphnia dubia*: Chronic Toxicity Of Parabens And Their Chlorinated By-Products. *Environmental Toxicology*, v. 30, 6, p. 664–673, 2015. <https://doi.org/10.1002/tox.21944>

THAKKAR, S.; SEETHARAMAN, B.; RAMASAMY, V. Impact of chronic sub-lethal methylparaben exposure on cardiac hypoxia and alterations in neuroendocrine factors in zebrafish model. *Molecular Biology Reports*, v. 49, 1, p. 331–340, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06878-w>

THOMAS, K. V. et al. Screening for Selected Human Pharmaceuticals and Cocaine in the Urban Streams of Manaus, Amazonas, Brazil. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, v. 50, 2, p. 302–308, 2014. <https://doi.org/10.1111/jawr.12164>

THOMOPOULOS, C. et al. Beta-blockers in hypertension: overview and meta-analysis of randomized outcome trials. *Journal of Hypertension*, v. 38, 9, p. 1669–1681, 2020. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002523>

TIJANI, J. O. et al. Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 14, 1, p. 27–49. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0537-z>

TIXIER, C. et al. Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 6, p. 1061–1068, 2003. <https://doi.org/10.1021/es025834r>

TOBLER, M. et al. Life on the edge: hydrogen sulfide and the fish communities of a Mexican cave and surrounding waters. **Extremophiles**, v. 10, 6, p. 577–585, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0531-2>

TOKANOVÁ, N. et al. The effect of sulfamethoxazole on oxidative stress indices in zebrafish (*Danio rerio*). **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, 1, p. 58–63, 2021. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1560465>

TRAN, N. H.; URASE, T.; TA, T. T. A Preliminary Study on the Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in Hospital Wastewater and Surface Water in Hanoi, Vietnam: Occurrence of Pharmaceuticals in Hanoi's Water Environment. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 42, n. 3, p. 267–275, mar. 2014. <https://doi.org/10.1002/clen.201300021>

TRIEBSKORN, R. et al. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, 4, p. 1405–1416, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1033-x>

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.1, p. 151-173, 1977. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(77\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1)

TYUMINA, E. A. et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Emerging Contaminants. **Microbiology**, v. 89, 2, p. 148–163, 2020. <https://doi.org/10.1134/S0026261720020125>

VAN DEN BRANDHOF, E.-J.; MONTFORTS, M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, 8, p. 1862–1866, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.031>

VASCONCELOS, F. R. et al. Bottom-up and top-down effects of browning and warming on shallow lake food webs. **Global Change Biology**, v. 25, 2, p. 504–521, 2019. <https://doi.org/10.1111/gcb.14521>

VERAS, T. B. et al. Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. **Chemosphere**, v. 222, p. 961–969, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.167>

VERRENGIA GUERRERO, N. R. et al. Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates. *Environmental Pollution*, v. 117, n. 3, p. 523–530, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00132-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00132-4)

VILLANUEVA, J. D. et al. Fate and Transport of Ibuprofen in the Natural Surface Water of the Pasig River, Philippines. **International Journal of Environmental Science**, v. 2, p. 248-257, 2017. ISSN: 2367-8941

VITKU, J. et al. Endocrine Disruptors of the Bisphenol and Paraben Families and Bone Metabolism. **Physiological Research**, p. S455–S464, 2018. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934005>

WANG, J. et al. Toxicity of the cosmetic preservatives parabens, phenoxyethanol and chlorphenesin on human meibomian gland epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 196, p. 108057, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108057>

WANG, X. H. et al. Relationship between acute and chronic toxicity for prevalent organic pollutants in *Vibrio fischeri* based upon chemical mode of action. **Journal Hazard Mater.**, v. 338, p. 458-465. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.058>

WATKINSON, A. J. et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. **Science of The Total Environment**, v. 407, 8, p. 2711–2723, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>

WEI, F. et al. Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review. **Science of The Total Environment**, v. 778, p. 146150, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146150>

WEINSTEIN, R. et al. A systematic assessment of the epidemiologic literature regarding an association between acetaminophen exposure and cancer. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 127, p. 105043, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105043>

WHITTLE, B. J. R. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs and GI toxicity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, 3, p. 301–313, 3 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2003.00135.x>

WILDE, M. L. **Beta-bloqueadores em efluente hospitalar: ocorrência, degradação por processos avançados de oxidação e identificação de subprodutos**. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 280, 2011.

WILDE, M. L.; KÜMMERER, K.; MARTINS, A. F. Multivariate optimization of analytical methodology and a first attempt to an environmental risk assessment of β -blockers in hospital wastewater. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, 9, p. 1732–1740, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000035>

WIYSONGE, C. S. et al. Beta-blockers for hypertension. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2017, 1, 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002003.pub5>

WOLLENBERGER, L. et al. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, p. 723-730, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00443-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00443-9)

WONG, G. W.; WRIGHT, J. M. Blood pressure lowering efficacy of nonselective beta-blockers for primary hypertension. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, vol. 2, 2014. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007452.pub2>

XU, M. et al. Synergistic effects of UVC and oxidants (PS vs. Chlorine) on carbamazepine attenuation: Mechanism, pathways, DBPs yield and toxicity assessment. **Chemical Engineering Journal**, v. 413, p. 127533, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127533>

ZAGATTO, P.A. BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. **RiMa**, São Carlos, SP, Brazil, 2008. 486 p. ISBN – 978-85-7656-136-1

ZENKER, A. et al. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. **Journal of Environmental Management.**, v. 133, p. 378-387, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.017>

ZHANG, J. et al. Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: a review. **Sci Total Environ.**, v. 445-446, p. 281-298, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.061>

ZHAO, D. et al. Mitigation of acidogenic product inhibition and elevated mass transfer by biochar during anaerobic digestion of food waste. **Bioresource Technology**, v. 338, p. 125531, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125531>

ZHOU, X. F. et al. A preliminary study on the occurrence and behavior of carbamazepine (CBZ) in aquatic environment of Yangtze River Delta, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 173, n. 1–4, p. 45–53, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1369-8>

ZHU, Y. G. et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, p. 3435–3440, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>

ZIND, H. et al. Occurrence of carbamazepine, diclofenac, and their related metabolites and transformation products in a French aquatic environment and preliminary risk assessment. **Water Research**, v. 196, p. 117052, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117052>

ZINI, L. B.; GUTTERRES, M. Chemical contaminants in Brazilian drinking water: a systematic review. **Journal of Water and Health**, v. 19, 3, p. 351–369, 2021. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.264>

ŻUR, J. et al. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, 22, p. 21498–21524, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2517-x>

APÊNDICES

Apêndice A – Monitoramento dos parâmetros químicos durante os bioensaios da etapa 1 (sem MPOs)

Tabela 32 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator Ac

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}^1$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
Ac (reator de fase dupla)	Controle	6,10	5,40	41,20	40,30	7,50	7,31	
	6%	5,42	4,91	122,20	123,20	8,22	8,12	
	Toxicidade aguda	12,50%	5,49	5,22	199,90	202,40	8,14	7,95
		25%	4,70	4,51	356,00	348,30	7,50	7,48
		50%	4,90	4,77	679,00	633,00	7,46	7,33
		100%	4,60	4,45	1.301,00	1.306,00	7,28	7,28
	Controle	6,10	5,00	41,20	39,40	7,50	7,11	
	6%	5,42	4,30	122,20	110,60	7,46	6,95	
	Toxicidade crônica	12,50%	5,49	4,44	199,90	189,20	7,28	7,19
		25%	4,70	4,10	356,00	332,10	7,13	6,76
		50%	4,90	3,55	679,00	601,20	7,15	6,10
		75%	5,10	4,20	845,00	832,00	6,65	5,96

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 33 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M2

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M2 (reator de fase dupla)	Controle	6,80	6,65	41,18	41,00	7,59	7,44	
	6%	5,80	5,37	130,20	129,00	8,45	8,33	
	Toxicidade aguda	12,50%	5,20	5,14	199,00	192,00	8,59	8,48
		25%	5,99	5,21	355,00	358,00	8,83	8,62
		50%	5,10	4,83	670,00	664,00	8,88	8,71
		100%	4,30	3,65	1325,00	1300,00	9,17	8,64
	Controle	6,80	6,77	41,18	42,10	7,59	7,12	
	6%	5,80	5,09	130,20	134,00	8,45	8,22	
	Toxicidade crônica	12,50%	5,20	4,34	199,00	203,00	8,59	8,12
		25%	5,99	4,12	355,00	359,00	8,83	8,54
		50%	5,10	3,95	670,00	668,00	8,88	8,56
		75%	4,90	3,80	1058,00	164,00	8,78	8,41

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 34 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M1

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M1 (reator de fase única)	Controle	5,90	5,10	44,30	41,10	7,41	7,32	
	6%	5,20	4,80	168,90	160,10	7,66	7,58	
	Toxicidade aguda	12,50%	4,80	4,60	258,00	257,00	8,06	7,90
		25%	4,50	4,10	472,00	466,00	8,17	7,90
		50%	4,40	4,10	881,00	854,00	8,31	8,10
		100%	3,90	3,66	1690,00	1694,00	8,53	8,29
	Controle	5,90	5,20	44,30	42,30	7,41	7,18	
	6%	5,20	5,12	168,90	161,20	7,66	7,55	
	Toxicidade crônica	12,50%	4,80	4,44	258,00	259,10	8,06	8,00
		25%	4,50	3,99	472,00	470,80	8,17	8,10
		50%	4,40	3,32	881,00	879,00	8,31	7,99
		75%	4,05	3,55	1315,00	1308,00	8,33	7,80

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 35 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com *C. silvestrii* expostos às amostras do reator Ac

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
Ac (reator de fase dupla)	Controle	6,40	6,21	163,00	165,00	7,38	7,32	
	6%	6,10	5,48	222,00	225,00	8,01	7,80	
	Toxicidade aguda	12,50%	5,60	5,30	295,00	300,00	7,76	7,45
		25%	5,80	5,22	431,00	402,00	7,38	7,22
		50%	5,20	4,78	716,00	684,00	7,00	6,58
		100%	4,80	4,30	1.265,00	1.341,00	6,76	6,11
	Controle	6,28	6,11	158,00	154,00	7,22	7,10	
	0,78%	6,50	6,32	173,00	165,00	7,73	7,25	
	Toxicidade crônica	1,56%	7,25	6,89	180,40	168,00	7,66	7,41
		3,10%	7,08	6,87	197,30	191,20	7,24	6,88
		6,00%	6,88	6,49	186,30	188,60	7,49	7,41
		12,50%	7,03	6,89	202,40	180,40	7,13	6,78

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 36 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com *C. silvestrii* expostos às amostras do reator M2

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M2 (reator de fase dupla)	Controle	6,40	6,21	163,00	165,00	7,38	7,32	
	6%	6,00	5,36	246,00	222,30	7,95	8,04	
	Toxicidade aguda	12,50%	5,60	5,11	281,00	248,40	8,01	8,14
		25%	5,90	5,30	444,00	439,60	8,05	7,41
		50%	5,20	4,97	727,00	726,00	8,22	8,10
		100%	4,90	4,21	1309,00	1308,00	8,31	8,29
	Toxicidade crônica	Controle	6,28	6,11	158,00	154,00	7,22	7,10
		0,78%	7,12	6,28	176,90	178,30	7,78	7,75
		1,56%	7,03	6,65	170,40	165,20	7,72	7,05
		3,10%	7,06	6,12	181,40	179,80	7,72	7,34
		6,00%	6,95	6,03	187,30	188,10	7,82	6,93
		12,50%	7,08	6,23	251,80	256,30	7,95	6,41

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 37 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa sem MPOs, com *C. silvestrii* expostos às amostras do reator M1

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M1 (reator de fase única)	Controle	6,40	6,21	163,00	165,00	7,38	7,32	
	6%	6,20	5,93	249,00	236,00	8,05	7,95	
	Toxicidade aguda	12,50%	5,90	5,32	352,00	349,20	8,38	8,16
		25%	5,80	5,26	521,00	522,30	8,46	8,27
		50%	5,11	4,69	931,00	926,80	8,65	8,19
		100%	3,98	3,51	1727,00	1735,00	8,66	8,03
	Toxicidade crônica	Controle	6,28	6,11	158,00	154,00	7,22	7,10
		0,78%	7,20	6,88	172,80	178,00	8,08	7,65
		1,56%	6,70	6,45	188,20	175,00	8,07	7,81
		3,10%	7,20	6,52	191,30	188,20	7,93	7,33
		6,00%	6,40	5,89	349,00	353,10	7,81	7,30
		12,50%	6,24	6,13	369,00	345,20	7,66	6,95

Fonte: Autoria própria (2022).

Apêndice B – Monitoramento dos parâmetros químicos durante os bioensaios da etapa 2 (contendo MPOs)

Tabela 38 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras afluentes

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
Afluente	Controle	7,24	6,21	55,60	55,00	7,28	7,16	
	6%	6,70	6,20	144,20	142,80	7,66	7,04	
	Toxicidade aguda	12,50%	6,45	6,24	492,00	493,00	7,71	6,96
		25%	6,23	5,98	512,00	508,00	7,79	7,24
		50%	5,98	5,13	648,00	655,20	7,94	7,38
	100%	4,95	3,88	1.196,00	1.189,00	8,14	7,82	
	Controle	7,24	6,30	55,60	49,70	7,28	6,95	
	6%	7,24	5,60	196,20	196,30	8,17	8,12	
	Toxicidade crônica	12,50%	6,70	5,48	271,00	270,70	8,28	7,97
		25%	6,45	5,62	407,00	406,00	8,46	8,13
		50%	6,23	4,97	733,00	733,00	8,57	8,22
		75%	5,98	3,28	898,00	892,10	8,81	8,41

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 39 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator Ac

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
Ac (reator de fase dupla)	Controle	7,24	6,21	55,60	55,00	7,28	7,16	
	6%	7,12	6,88	107,30	105,70	7,66	7,54	
	Toxicidade aguda	12,50%	6,49	6,39	156,90	158,30	7,71	7,61
		25%	5,98	5,27	237,00	232,00	7,79	7,34
		50%	5,22	3,97	421,00	426,00	7,94	7,08
	100%	3,92	3,31	789,00	784,00	8,14	7,68	
	Controle	7,24	6,30	55,60	49,70	7,28	6,95	
	6%	7,12	5,98	167,20	162,70	7,66	7,28	
	Toxicidade crônica	12,50%	6,49	5,21	197,00	195,00	7,71	7,01
		25%	5,98	4,68	313,00	312,40	7,79	6,78
		50%	5,22	3,41	514,00	514,20	7,94	7,06
		75%	4,04	3,15	597,00	598,10	8,00	6,98

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 40 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M2

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M2 (reator de fase dupla)	Toxicidade aguda	Controle	7,24	6,21	55,60	55,00	7,28	7,16
		6%	6,88	6,34	105,20	104,10	7,90	7,57
		12,50%	6,24	6,11	183,00	184,00	8,09	7,61
		25%	6,04	5,91	276,40	278,00	8,37	7,82
		50%	5,26	5,04	515,00	513,00	8,54	7,80
		100%	3,47	3,16	996,10	997,10	8,66	8,14
	Toxicidade crônica	Controle	7,24	6,30	55,60	49,70	7,28	6,95
		6%	6,88	6,12	151,50	151,00	8,12	7,78
		12,50%	6,24	5,84	194,00	192,40	8,05	7,80
		25%	6,04	5,30	324,00	323,80	8,17	7,80
		50%	5,26	4,14	505,00	505,00	7,97	7,31
		75%	4,04	3,47	704,30	704,00	7,74	7,29

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 41 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com os organismos bentônicos expostos às amostras do reator M1

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M1 (reator de fase única)	Toxicidade aguda	Controle	7,24	6,21	55,60	55,00	7,28	7,16
		6%	6,95	6,34	140,70	139,40	7,94	7,09
		12,50%	6,68	6,41	218,00	218,00	8,07	7,82
		25%	6,04	5,93	229,00	231,00	8,38	7,89
		50%	5,88	5,64	732,00	733,00	8,32	8,04
		100%	5,30	4,88	921,00	922,40	8,87	7,95
	Toxicidade crônica	Controle	7,24	6,30	55,60	49,70	7,28	6,95
		6%	6,95	5,98	175,70	173,40	7,94	6,93
		12,50%	6,68	5,47	252,00	255,10	8,07	7,07
		25%	6,04	5,12	361,00	361,00	8,38	7,23
		50%	5,88	4,95	647,00	647,00	8,32	7,21
		75%	5,10	3,87	732,00	729,40	8,56	7,37

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 42 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com *C. silvestrii* expostos às amostras afluente

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
Afluente	Toxicidade aguda	Controle	-	-	148,00	149,00	7,24	7,12
		6%	-	-	200,00	199,70	7,41	7,24
		12,50%	-	-	255,00	255,00	7,58	7,22
		25%	-	-	373,00	372,00	7,55	7,28
		50%	-	-	605,00	607,40	7,78	7,31
		100%	-	-	897,00	898,00	7,89	7,41
	Toxicidade crônica	Controle	-	-	155,20	155,00	7,85	7,81
		0,78%	-	-	159,40	154,80	7,22	7,14
		1,56%	-	-	166,40	165,80	7,32	7,24
		3,10%	-	-	176,00	174,00	7,79	7,57
		6,00%	-	-	216,00	215,00	7,60	7,54
		12,50%	-	-	281,00	281,00	7,80	7,77

Sem o equipamento de monitoramento do OD
Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 43 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com *C. silvestrii* expostos às amostras do reator Ac

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
Ac (reator de fase dupla)	Toxicidade aguda	Controle	-	-	148,00	149,00	7,24	7,12
		6%	-	-	180,00	180,00	7,58	7,19
		12,50%	-	-	221,00	221,00	7,37	7,21
		25%	-	-	294,00	301,00	7,22	6,94
		50%	-	-	435,00	436,00	7,19	6,87
		100%	-	-	787,00	788,00	7,04	6,61
	Toxicidade crônica	Controle	-	-	155,20	155,00	7,85	7,81
		0,78%	-	-	175,10	175,00	8,14	8,00
		1,56%	-	-	180,60	178,90	7,66	7,68
		3,10%	-	-	184,70	184,00	6,70	6,50
		6,00%	-	-	189,10	188,00	6,42	6,16
		12,50%	-	-	225,40	224,00	5,98	5,47

Sem o equipamento de monitoramento do OD
Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 44 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com *C. silvestrii* expostos às amostras do reator M2

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M2 (reator de fase dupla)	Toxicidade aguda	Controle	-	-	148,00	149,00	7,24	7,12
		6%	-	-	180,00	174,60	8,14	7,98
		12,50%	-	-	216,00	215,00	8,18	7,92
		25%	-	-	306,00	304,90	8,29	8,12
		50%	-	-	471,00	471,00	8,50	8,22
		100%	-	-	731,00	729,00	8,79	8,48
	Toxicidade crônica	Controle	-	-	155,20	155,00	7,85	7,81
		0,78%	-	-	169,80	171,00	7,90	7,84
		1,56%	-	-	178,10	176,00	7,46	7,29
		3,10%	-	-	184,70	184,00	7,28	7,14
		6,00%	-	-	189,20	193,00	7,19	6,98
		12,50%	-	-	230,00	232,00	7,08	6,79

Sem o equipamento de monitoramento do OD
Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 45 - Parâmetros monitorados durante a realização dos ensaios na etapa contendo MPOs, com *C. silvestrii* expostos às amostras do reator M1

Etapa 1 (sem MPOs)		OD (mg/L)		Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)		pH		
		Antes	depois	antes	depois	antes	depois	
M1 (reator de fase única)	Toxicidade aguda	Controle	-	-	148,00	149,00	7,24	7,12
		6%	-	-	208,00	205,60	8,03	7,84
		12,50%	-	-	277,00	277,00	8,32	8,00
		25%	-	-	417,00	414,50	8,51	8,22
		50%	-	-	702,00	700,00	8,84	8,39
		100%	-	-	108,60	109,00	8,89	8,19
	Toxicidade crônica	Controle	-	-	155,20	155,00	7,85	7,81
		0,78%	-	-	111,40	110,00	6,00	5,80
		1,56%	-	-	107,30	106,00	6,63	6,41
		3,10%	-	-	109,20	111,10	7,42	7,27
		6,00%	-	-	118,80	118,00	7,93	7,84
		12,50%	-	-	292,00	290,00	8,12	8,00

Sem o equipamento de monitoramento do OD
Fonte: Autoria própria (2022).