



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Fernanda de Oliveira Mury França

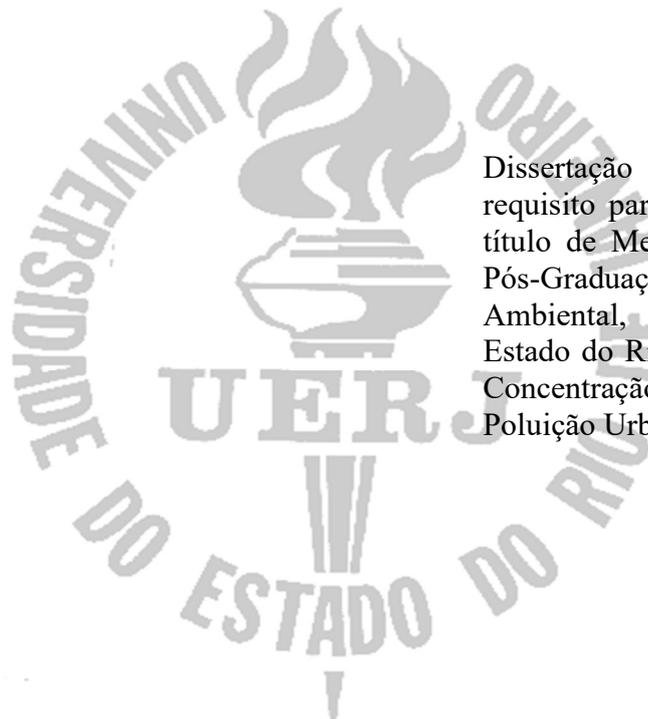
**Avaliação de Atividade Estrogênica e Toxicidade de Lixiviados de Resíduos
Sólidos Urbanos**

Rio de Janeiro

2016

Fernanda de Oliveira Mury França

**Avaliação de atividade estrogênica e toxicidade de lixiviados de resíduos sólidos
urbanos**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

F814 França, Fernanda de Oliveira Mury.

Avaliação de atividade estrogênica e toxicidade de
lixiviados de resíduos sólidos urbanos / Fernanda de Oliveira
Mury França. – 2016.

115f.

Orientador: Daniele Maia Bila.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio
de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia Ambiental 2. Resíduos sólidos urbanos -
Dissertações. 3. Toxicidade Aguda - Dissertações. 4.
Desreguladores endócrinos - Dissertações. I. Bila, Daniele
Maia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. III.
Título.

CDU 628.4

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação.

Assinatura

Data

Fernanda de Oliveira Mury França

Avaliação de atividade estrogênica e toxicidade de lixiviados de resíduos sólidos urbanos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Daniele Maia Bila (Orientadora)

Faculdade de Engenharia – UERJ

Prof.^a Dr.^a Elisabeth Ritter

Faculdade de Engenharia – UERJ

Prof.^a Dr.^a Camille Ferreira Mannarino

ENSP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por permitir mais esta vitória em minha vida, e a minha família, por todo o apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente na minha vida, sempre me guardando, me guiando, me dando sabedoria, paciência, coragem e força para vencer os obstáculos da vida.

Aos meus pais, Elizabeth e Luiz Carlos, que com muito sacrifício sempre me deram o melhor, mas me ensinaram também a correr atrás dos meus sonhos.

A minha irmã e cunhado, pelo incentivo e carinho ao longo desses dois anos.

A minha querida orientadora Daniele Maia Bila, o meu enorme carinho por ter me escolhido para ser sua orientada. Deus atendeu as minhas orações, porque eu também a teria escolhido se fosse possível. Sua amizade, paciência e carinho com os alunos são sua marca, obrigada por ser desse jeito.

Aos minhas amigas do Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da UERJ, amei conhecer cada uma de vocês, mas meu agradecimento em especial vai para as meninas do laboratório: Caroline Teixeira, Louise Felix, Giselle Gomes, Mariana Barcellos, Flávia Licurgo, Mariana Luna, Larissa Silva, Carolina Gomes, Amanda Mansur, Juliana Morimoto e Joana Miloski que me ensinaram várias coisas em tão pouco tempo.

Aos técnicos do LES, Sidnei e Rita, que me ensinaram a fazer todas as análises físico-químicas e sempre se mostraram prestativos quando necessitava de algo.

Ao seu Jair, sua ajuda também no laboratório, por ser sempre tão prestativo.

A minha estagiária querida, Clara Bravo, por toda ajuda.

A aluna de doutorado da escola de química (EQ/UFRJ), Letícia Lima, pelo auxílio nas análises.

Ao pessoal do Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI) da UERJ, por nos deixar usar o equipamento para a leitura das placas do YES.

Aos meus amigos do mestrado da turma de 2014 e 2015, além dos já citados: Amanda Monteiro, Mariane Rodrigues, Denise Torres, Renata Simões, Paula Bermudes, Daniela Ribeiro, Vanda Azevedo, Thyago Araújo, Marcelle Fonseca, Marisa Magalhães e Josie Batista, amei conhecê-los e os dias ficaram mais fáceis com a presença de vocês, com as nossas conversas e risadas.

Aos professores do PEAMB que foram fundamentais na conquista desse título, obrigada por todo o ensinamento.

Aos membros da Primeira Igreja Batista do Parque Leopoldina, por saber que eu estava sempre em suas orações ao longo dessa jornada.

Aos parentes e amigos que torceram por mais essa vitória na minha vida.

Entender a vontade de Deus nem sempre é fácil, mas crer que Ele está no comando e tem um plano pra nossa vida, faz a caminhada valer à pena.

RESUMO

FRANÇA, Fernanda de Oliveira Mury. *Avaliação de atividade estrogênica e toxicidade de lixiviados de resíduos sólidos urbanos*. 2016. 115f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Os lixiviados de resíduos sólidos urbanos, líquido escuro formado pela decomposição da massa de lixo mais a percolação de água das chuvas, provenientes de aterros sanitários, podem ser uma importante fonte de contaminação para águas subterrâneas e superficiais, caso não haja impermeabilização do solo e tratamento adequado. A complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas presentes no lixiviado pode causar toxicidade aos organismos expostos ou gerar alguma desregulação no sistema endócrino de seres humanos e outros animais, mesmo em concentrações muito baixas. Em função dos problemas ambientais ocorridos atualmente, como contaminação do solo, ou mesmo contaminação de águas subterrâneas e superficiais quando próximos aos locais de disposição dos resíduos, e, visando avaliar o potencial tóxico do lixiviado, bioensaios de toxicidade aguda foram realizados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre organismos de diferentes níveis tróficos (*Lactuca sativa*, *Daphnia simillis*, *Danio rerio* e *Aliivibrio fischeri*) e avaliar a eficiência de processos de tratamento. No intuito de determinar a presença de atividade estrogênica e quantificar os estrogênios presentes nas amostras, foram realizados o ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/FLU) para a determinação do bisfenol A (BPA) e dos estrogênios estriol (E₃), 17β-estradiol (E₂) e 17α-etinilestradiol (EE₂). Amostras de lixiviado bruto de dois aterros e de um lixão localizados na baixada fluminense foram coletadas, e em apenas um dos aterros foi possível a coleta de lixiviado tratado. Todas as amostras analisadas, brutas e tratadas, demonstraram-se tóxicas para dos organismos analisados no estudo. O ensaio YES mostrou-se eficiente na determinação de atividade estrogênica em algumas amostras. Contudo, em alguns casos, a complexidade da matriz resultou em incertezas nos resultados, uma vez que a interferência de outros compostos químicos presentes na amostra interferiu no resultado da atividade estrogênica. As análises químicas mostraram a presença dos desreguladores endócrinos E₂, EE₂, E₃ e BPA nas amostras de lixiviado bruta e tratada.

Palavras-chave: Lixiviado; Desreguladores endócrinos; Ensaio *in vitro* YES; Toxicidade aguda; CLAE.

ABSTRACT

FRANÇA, Fernanda de Oliveira Mury. *Evaluation of estrogenic activity and toxicity of leachate solid waste*. 2016. 115f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The leachates from municipal solid waste, dark liquid formed by the decomposition of the waste mass over the percolation of rainwater, from sanitary landfills or not, can be a major source of contamination of groundwater and surface water, if there is no soil sealing and appropriate treatment. The complex mixture of organic and inorganic substances present in the leachate can cause toxicity to organisms exposed or generate any endocrine disruption in humans and other animals, even at very low concentrations. Due to the environmental problems currently occurring, such as soil contamination, or contamination of groundwater and surface when close to the waste disposal sites, and to evaluate the potential toxicity of the leachate, bioassays of acute toxicity experiments were conducted to measure the effects of toxic agents on organisms of different trophic levels (*Lactuca sativa*, *Daphnia simillis*, *Danio rerio* e *Aliivibrio fischeri*) and evaluate the effectiveness of treatment processes. In order to determine the presence of estrogenic activity and quantify estrogens present in the samples were performed a *in vitro* assay - YES (*Yeast Estrogen Screen*) and high-performance liquid chromatography (HPLC/FLU) for the determination of bisphenol A (BPA) and estrogens: estriol (E₃), 17β - estradiol (E₂) and 17α - ethinylestradiol (EE₂). Raw leached samples from two landfills and a garbage dump located in the Baixada Fluminense were collected, and only one of the landfills collecting treated leachate was possible. All samples analyzed, raw and treated, proved to be toxic to the organisms analyzed in the study. The YES assay was effective in determining estrogenic activity in some samples, however, in some cases, the complexity of the matrix resulted in uncertainties in the results, since the interference from other chemical compounds present in the sample interfere in the results of estrogenic activity. Chemical analysis showed the presence of endocrine disruptors E₂, EE₂, E₃ and BPA in samples of raw and treated leached.

Keywords: Leachate; Endocrine disruptors; *In vitro* assay YES; Acute toxicity; HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem referente à destinação final dos RSU no Brasil em toneladas por dia em 2014.	21
Figura 2: Estrutura hipotética para os ácidos húmicos.....	27
Figura 3: Estrutura hipotética para os ácidos fúlvicos.	28
Figura 4: Mecanismos de atuação dos DEs.....	31
Figura 5: Rotas de contaminação e exposição humana aos micropoluentes.....	32
Figura 6: Diferença na estrutura do BPA e dos hormônios estrógenos.	35
Figura 7: Estrutura química de estrogênios naturais (E_2 e E_3) e sintéticos (EE_2).	36
Figura 8: Etapas envolvidas na EFS.....	37
Figura 9: Esquema demonstrativo da separação dos componentes de uma mistura até a formação de picos cromatográficos usando CLAE.	41
Figura 10: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica em ensaio YES utilizando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
Figura 11: Ilustração do organismo <i>Lactuca sativa</i>	46
Figura 12: Ilustração do organismo <i>Daphnia simillis</i> adulta.	48
Figura 13: Ilustração do organismo <i>Danio rerio</i> adulto.....	49
Figura 14: Ilustração do organismo <i>Aliivibrio fischeri</i>	51
Figura 15: Fluxograma das etapas realizadas para o tratamento das amostras.	53
Figura 16: Foto da resina XAD-8 armazenada em metanol.....	58
Figura 17: Foto do aparato com resina XAD-8 utilizado na separação das frações AF e HYI.	59
Figura 18: Foto das placas de Petri armazenadas no interior da estufa no ensaio com <i>Lactuca sativa</i>	61
Figura 19: Demonstração da medição da raiz após germinação da semente de alface.	62
Figura 20: Foto da germinação das sementes de alface em uma placa de Petri ao final do ensaio.	62
Figura 21: Foto do aparato de filtração usado nas amostras de lixiviados de RSU.	65
Figura 22: Foto do papel de filtro e membranas utilizadas no processo de filtração das amostras de lixiviados de RSU.....	65
Figura 23: Foto dos cartuchos STRATA SAX acoplado ao cartucho OASIS HLB na etapa de passagem da amostra pelos cartuchos durante a EFS.....	67

Figura 24: Foto das membranas utilizadas na filtração de amostras brutas após acidificação com ácido clorídrico.....	68
Figura 25: Fluxograma detalhado das etapas de preparo das amostras até o extrato final para a realização do ensaio YES e para análise na CLAE.....	69
Figura 26: Demonstração da disposição do controle positivo (17 β -estradiol), da amostra e do branco na placa de 96 poços.....	73
Figura 27: Placa de ensaio antes e após incubação.....	74
Figura 28: Equipamento de CLAE.....	78
Figura 29: Carta controle da <i>Lactuca sativa</i>	86
Figura 30: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste <i>Lactuca sativa</i>	86
Figura 31: Carta controle da <i>Daphnia simillis</i>	88
Figura 32: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste <i>Daphnia simillis</i>	89
Figura 33: Carta controle do <i>Danio rerio</i>	89
Figura 34: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste <i>Danio rerio</i>	90
Figura 35: Carta controle da <i>Aliivibrio fischeri</i>	91
Figura 36: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste <i>Aliivibrio fischeri</i>	92
Figura 37: Curva dose-resposta do ensaio YES: amostra A2 bruta com volume de extração de 10 mL.	95
Figura 38: Curvas doses-respostas do ensaio YES: controle positivo e amostra A2 bruta com volume de extração de 10 mL (A2.1 bruta) dopada com E2.	96
Figura 39: Curva dose resposta no ensaio YES para a amostra C utilizando 100 mL de volume de extração.....	96
Figura 40: Curvas doses-respostas no ensaio YES para a amostra de lixiviado B1 bruta e tratada.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação das características de lixiviados gerados em aterros sanitários brasileiros.	25
Tabela 2: Compostos classificados como DEs.	30
Tabela 3: Guia de seleção de sorventes utilizados em cartuchos em função do analito de interesse.	39
Tabela 4: Código das amostras de lixiviado com localização e data de coleta.	54
Tabela 5: Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias descritas em APHA (2012).	56
Tabela 6: Características dos cartuchos usados na metodologia proposta.	66
Tabela 7: Identificação das amostras usadas com diferentes volumes na EFS.	68
Tabela 8: Variação dos solventes (ACN e H ₂ O ultra pura) com o tempo em modo gradiente.	79
Tabela 9: Concentrações teóricas de E ₂ , EE ₂ e E ₃ para a construção da curva analítica.	79
Tabela 10: Concentrações teóricas de bisfenol A para a construção da curva analítica.	80
Tabela 11: Concentrações e volumes dos padrões de E ₂ , EE ₂ , E ₃ e BPA usadas na dopagem de uma das amostras brutas de lixiviado coletadas para o teste de recuperação.	81
Tabela 12: Valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de lixiviado bruto e tratado proveniente de aterro sanitário (A e B) e valores dos parâmetros para a amostra proveniente do lixão (C).	83
Tabela 13: Concentração de substâncias húmicas das amostras A3 bruta, B1 bruta e C bruta, e suas respectivas frações de ácido húmico e ácido fúlvico.	84
Tabela 14: Valores de CE(L)50 para os diferentes organismos.	93
Tabela 15: Estimativa da toxicidade da amostra A2.1 bruta em cada poço da placa de 96 poços no ensaio YES.	94
Tabela 16: Estimativa de toxicidade da amostra C3 em cada poço da placa de 96 poços no ensaio YES.	97
Tabela 17: Concentrações dos hormônios E ₃ , E ₂ e EE ₂ e do BPA determinados na CLAE/FLU.	100

Tabela 18: Valores de LD e LQ para os hormônios e BPA na CLAE/FLU. 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABRELPE	Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
Abs	Absorbância
Abs _{corrigida}	Absorbância corrigida
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fúlvico
AH	Ácido húmico
BPA	Bisfenol-A
CE50	Concentração efetiva média
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CL ₅₀	Concentração letal média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-FLU	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
CLC	Cromatografia líquida clássica
COD	Carbono orgânico dissolvido
CPRG	<i>chlorophenol red-β-D-galactopyranoside</i>
CSF	Cromatografia supercrítica
DEs	Desreguladores endócrinos
DEP	Dietil ftalato
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
E ₂	17β-estradiol
E ₃	Estriol

EE ₂	17 α -etinilestradiol
EFS	Extração em fase sólida
EQ-E ₂	Equivalente 17 β -estradiol
ETA	Estação de tratamento de água
ETDI	Estação de tratamento de despejos industriais
ETE	Estação de tratamento de esgoto
ERE	Elementos de respostas de estrogênios
HPLC	<i>High Performance / Pressure Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
PAES	Ésteres ftálicos
PET	Poli tereftalato de etila
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
PNSB	Pesquisa Nacional de Saneamento Básico
POP _s	Poluentes orgânicos persistentes
REh	Receptor de estrogênio humano
RSU	Resíduos sólidos urbanos
SDT	Sólidos dissovidos totais
SH	Substâncias húmicas
SNH	Substâncias não húmicas
SST	Sólidos suspensos totais
SVT	Sólidos voláteis totais
YES	<i>Yeast estrogen screen</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. OBJETIVOS	19
1.1. Geral	19
1.2. Específicos	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Resíduos sólidos urbanos	20
2.2. Lixiviados	22
2.2.1. Composição dos lixiviados	24
2.2.1.1. Presença de substâncias húmicas no lixiviado	25
2.3. Desreguladores endócrinos	28
2.3.1. Atividade estrogênica	33
2.3.2. Desreguladores endócrinos: Métodos de determinação em amostras ambientais	36
2.3.2.1. Extração em fase sólida (EFS)	37
2.3.2.2. Determinação e quantificação dos DEs: CLAE	39
2.3.2.3. Atividade estrogênica: ensaio <i>in vitro</i> YES	42
2.4. Ecotoxicidade	43
2.4.1. Organismos-teste	45
2.4.1.1. <i>Lactuca sativa</i>	46
2.4.1.2. <i>Daphnia simillis</i>	47
2.4.1.3. <i>Danio rerio</i>	49
2.4.1.4. <i>Aliivibrio fischeri</i>	50
3. METODOLOGIA	53
3.1. Matriz estudada	53
3.2. Coleta e armazenamento das amostras	55
3.3. Caracterização físico-química	55
3.3.1. Parâmetros físico-químicos	55
3.3.2. Determinação e fracionamento das substâncias húmicas	56
3.4. Ensaio de toxicidade aguda	60
3.4.1. Organismo-teste: <i>Lactuca sativa</i>	60
3.4.2. Organismo-teste: <i>Daphnia simillis</i>	63
3.4.3. Organismo-teste: <i>Danio rerio</i>	63

3.4.4. Organismo-teste: <i>Aliivibrio fischeri</i>	64
3.5. Análise dos DEs: ensaio YES e CLAE	64
3.5.1. Limpeza das vidrarias	64
3.5.2. Extração em Fase Sólida (EFS)	64
3.5.3. Ensaio <i>in vitro</i> YES	70
3.5.3.1. Reagentes	70
3.5.3.2. Preparo das soluções	70
3.5.3.3. Congelamento, descongelamento, pré-inóculo e inóculo.....	71
3.5.3.4. Preparo do meio de análise.....	71
3.5.3.5. Procedimento de análise do ensaio YES	72
3.5.3.6. Análise dos dados.....	75
3.5.4. Análises Cromatográfica (CLAE/FLU)	77
3.5.4.1. Determinação dos estrogênios.....	77
3.5.4.2. Determinação do bisfenol A.....	79
3.5.4.3. Análise da seletividade, LD, LQ, linearidade e recuperação.....	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4. 1. Caracterização físico-química dos lixiviados bruto e tratado	82
4. 2. Toxicidade das amostras nos diferentes organismos	85
4. 2.1. Toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Lactuca sativa</i>	85
4.2.2. Toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Daphnis simillis</i>	87
4.2.3. Toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Danio rerio</i>	89
4.2.4. Toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Aliivibrio fischeri</i>	91
4.2.5. Avaliação conjunta dos organismos.....	92
4. 3. Determinação de atividade estrogênica	93
4.3.1. Testes iniciais	93
4.3.2. Testes definitivos	98
4.4. Identificação e quantificação do bisfenol A e hormônios E₂, EE₂ e E₃	100
5. CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO 1: Preparo das soluções do ensaio YES	111
ANEXO 2: Curvas doses-respostas obtidas nos testes iniciais: Amostras A2.1, A2. 2, C1, C2 e C3 brutas	113
ANEXO 3: Curvas doses-respostas obtidas nos testes iniciais: A1.1 bruta e A1.2 bruta	114
ANEXO 4: Curvas doses-respostas obtidas no teste definitivo	115

INTRODUÇÃO

Desde o início do mundo, a geração de resíduos é algo muito presente, porém, principalmente com a era dos produtos industrializados, mudanças dos hábitos da sociedade e os avanços tecnológicos, a produção de lixo tem sido aumentada significativamente nos últimos anos (MACOHIN, 2007).

O lixiviado proveniente de resíduos sólidos urbanos (chorume) é gerado em função da decomposição natural desses resíduos que ocorre segundo a combinação de processos químicos, físicos e biológicos, controlados por fatores como condições climáticas e hidrogeológicas, características dos resíduos dispostos, forma de operação do aterro dentre outros fatores, além da percolação da água das chuvas na massa de resíduo (REIS, 2014; SOUTO, 2009). É uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas, que em sua composição causam danos ao meio ambiente, devido à elevada concentração de matéria orgânica recalcitrante e à toxicidade presentes (REIS, 2014).

Os lixiviados quando não tratados e dispostos de forma inadequada, podem causar problemas ambientais, como contaminação do solo, ou mesmo contaminação de águas subterrâneas e superficiais quando próximos aos locais de disposição dos resíduos, pela presença de compostos químicos que causam toxicidade aos organismos expostos. Em virtude destes acontecimentos, ensaios de toxicidade aguda têm sido utilizados para avaliar os efeitos de agentes tóxicos presentes na amostra sobre os organismos durante um curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste, além de ser um parâmetro de extrema importância na avaliação da eficiência de processos de tratamento.

Dentre os compostos químicos presentes no lixiviado, os de desregulação endócrina, substâncias que podem afetar o sistema endócrino dos seres humanos e animais mesmo em concentrações muito baixas, são investigados atualmente em efluentes de ETE e ETA com muita frequência, mas pouca atenção tem sido dada à determinação e remoção destes compostos de lixiviados de resíduos sólidos urbanos no Brasil (ISIDORI et al.,2003). No entanto, devido às altas concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos, dependentes da composição e idade do local de disposição dos resíduos principalmente, alguns xenoestrogênios (substâncias sintéticas com atividade estrogênica) como o Bisfenol A, por

exemplo, podem estar presentes em lixiviados de aterros sanitários (ASAKURA et al., 2004; COORS et al., 2003)

Em função da elevada quantidade de micropoluentes presentes em matrizes ambientais, associado ao conhecimento de possíveis implicações dos mesmos na saúde humana e animal quando presente no sistema endócrino foi realizado o aprimoramento de uma metodologia para concentração e extração de possíveis substâncias encontradas no lixiviado de RSU, em amostras brutas e tratadas, no intuito de identificar e quantificar substâncias no lixiviado consideradas DEs e que possuem atividade estrogênica. Além disso, identificar a presença de toxicidade nas amostras de lixiviado utilizando organismos-teste de níveis tróficos diferentes, ou seja, que possuem sensibilidades diferentes em função do tratamento realizado na amostra, demonstrando o quão eficiente foi o tratamento.

1. OBJETIVOS

1.1. Geral

Investigar a toxicidade aguda, avaliar a presença de atividade estrogênica e, identificar e quantificar alguns desreguladores endócrinos em lixiviados brutos e tratado oriundos da disposição de resíduos sólidos no estado do Rio de Janeiro.

1.2. Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda de amostras de lixiviados bruto e tratado em quatro organismos-teste diferentes: *Latuca sativa*, *AliiVibrio fischeri*, *Danio rerio* e *Daphnia simillis* por meio de bioensaios em amostras de lixiviado bruto e tratado.
- Analisar a atividade estrogênica presente nas amostras de lixiviado bruto e tratado pelo ensaio *in vitro* YES.
- Identificar e quantificar os estrogênios: estriol (E₃), 17β-estradiol (E₂) e 17α-etinilestradiol (EE₂) e bisfenol A (BPA) nas amostras de lixiviado bruto e tratado pela Extração em Fase Sólida (EFS) seguida pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Resíduos sólidos urbanos

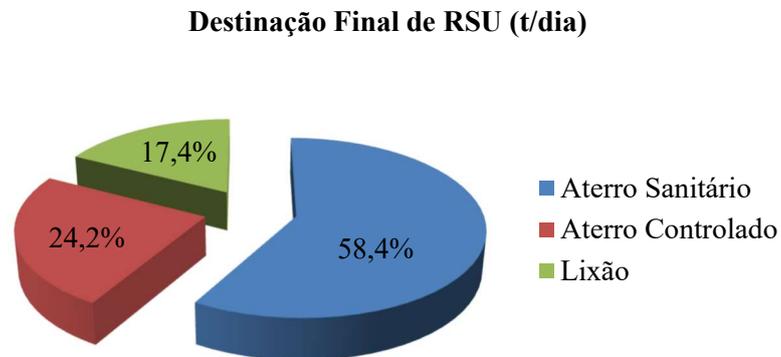
Segundo a Lei Federal nº 12.305/10 (Brasil, 2011) que instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos, os resíduos sólidos urbanos (RSU) englobam os resíduos domiciliares, provenientes das atividades domésticas, como papel/papelão, plásticos, vidro, metais, capina de jardim e principalmente restos de alimentos ou resíduos de limpeza urbana como originários de varrição e limpeza de logradouros e vias públicas.

Os aterros sanitários são os locais de disposição mais utilizados na gestão dos RSU e são economicamente viáveis (SANTOS, 2011). No entanto os RSU depositados continuamente, não são inertes, estando em constante transformação devido a diversos fenômenos de natureza física, química e biológica (TCHOBANOGLIOUS et al., 1993), e por isso, os locais de deposição dos resíduos necessitam de diversas medidas para a proteção do meio ambiente.

De acordo com uma pesquisa realizada pela ABRELPE (2014), 82,6% dos RSU são dispostos em aterros no Brasil, mas apenas 58,4% dos RSU produzidos por dia obtiveram destinação final ambientalmente adequada, sendo depositados em aterros sanitários, como pode ser observado na Figura 1. Os 41,6% restantes correspondem a 81 mil toneladas diárias de resíduos que são encaminhadas a lixões e aterros controlados, o qual pouco se difere dos lixões, pois não possuem sistema de impermeabilização do solo em que são dispostos, por exemplo, podendo infiltrar-se ao longo do solo e contaminar águas subterrâneas ou atingir águas superficiais por escoamento lateral, por não serem acondicionados de forma correta.

Dados disponibilizados pela ABRELPE (2014) demonstram que a maior parte da população brasileira vive em centros urbanos, e sua cultura reflete na produção de lixo no ambiente urbano. O desenvolvimento e o consumo desenfreado de novas tecnologias contribuem de forma significativa na produção de lixo tóxico, não somente de forma quantitativa, mas também de forma qualitativa pela crescente quantidade de resíduos tecnológicos. Portanto, a composição do lixo também tem sido alterada pela presença dos resíduos tecnológicos que abrangem objetos como lâmpadas, pilhas, baterias e produtos eletrônicos em geral, que são depositados em aterros comuns, ou seja, de forma incorreta podendo causar sérios danos à saúde da população e meio ambiente devido à presença de metais pesados no resíduo formado.

Figura 1: Porcentagem referente à destinação final dos RSU no Brasil em toneladas por dia em 2014.



Fonte: ABRELPE, 2014.

Assim como a quantidade de resíduos, a composição do lixo também está atrelada ao modo de vida da população, uma vez que segundo Cabral (2012) à medida que as cidades vão se tornando mais desenvolvidas, a quantidade de matéria orgânica no lixo diminui e a de materiais recicláveis aumenta. Capelini (2007) relata que nos últimos anos ocorreram mudanças na composição do lixo, e uma delas é a diminuição de matéria orgânica no lixo. No entanto, muitos países ainda possuem porcentagens relativamente maiores quando se refere ao composto matéria orgânica.

Dos resíduos orgânicos coletados, segundo a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS, 2010), apenas 1,6% é encaminhado para tratamento via compostagem, por não ser coletado separadamente, e conseqüentemente encaminhado para disposição final, juntamente com os resíduos domiciliares.

De acordo com a NBR-8419 (ABNT, 1992), Aterro sanitário é definido como uma técnica de disposição de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) no solo, sem causar danos à saúde pública e à sua segurança, de forma a minimizar os impactos ambientais. Esta técnica utiliza princípios de engenharia para confinar os resíduos sólidos na menor área e reduzi-los ao menor volume possível. Pode ser ainda considerado como um grande reator onde ocorrem transformações químicas, físicas e biológicas que são controladas por diferentes fatores como condições climáticas, tipo de resíduos dispostos no aterro, infiltração de água da chuva, grau

de compactação e forma de operação do aterro, por exemplo, que precisam ser administrados da melhor forma no intuito de minimizar os riscos para o meio ambiente e saúde pública.

2.2. Lixiviados

O lixiviado gerado no aterro que resulta do processo de degradação natural dos resíduos sólidos e da água da chuva que infiltra e percola os mesmos resíduos, é uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas, e por isso, quando não tratados de forma adequada, podem contaminar o lençol freático e os cursos d'água próximos quando em contato, devido a toxicidade presente em algumas dessas substâncias (REIS, 2014; SOUTO, 2009).

Os lixiviados formados nos aterros sanitários mais comuns são formados pela decomposição de resíduos domésticos, comerciais e resíduos industriais, mas sem quantidades significativas de resíduos químicos específicos, caracterizado, portanto, por uma solução aquosa de material orgânico dissolvido (ácidos graxos voláteis, e compostos orgânicos mais refratários como ácidos húmicos e fúlvicos), compostos inorgânicos, metais pesados e compostos orgânicos xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico) presentes em menor concentração, como hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, pesticidas e outros (GOMES, 2009).

Para compreender as características do lixiviado analisado é preciso conhecer os processos de degradação que ocorrem no interior do aterro. De forma simplificada, o processo de decomposição do lixo se dá em quatro fases. A primeira fase é a fase mais curta durando em média um mês. A duração dessa fase depende da quantidade de oxigênio disponível para que os microrganismos degradem a matéria orgânica. Nesta fase há uma grande produção de CO₂ e o lixiviado produzido apresenta elevadas concentrações de sais de alta solubilidade, podendo ocasionar também a formação de sais contendo metais, pois muitos íons são solúveis em água em altas temperaturas (CASTILHOS, 2003).

Quando grande parte oxigênio é consumido, predominam as bactérias anaeróbias estritas ou facultativas, iniciando a segunda fase. Essa segunda fase se caracteriza pela transformação da matéria orgânica hidrolisada, contudo, sem ocorrer nenhuma estabilização

da matéria orgânica. Nesta fase, que pode durar anos, são produzidos principalmente ácidos graxos voláteis (CASTILHOS,2003).

Na terceira fase, encontram-se o ácido acético, por exemplo, um dos principais ácidos graxos produzidos e grandes quantidades de nitrogênio amoniacal. O pH do lixiviado é então diminuído, variando entre 4 e 6, devido a combinação entre os ácidos formados nesta etapa e a água percolada através dos resíduos. O caráter ácido da solução formada auxilia na solubilização de materiais orgânicos, podendo apresentar altas concentrações de ferro, manganês, zinco, cálcio e magnésio, além disso, acarretam na liberação de gás sulfídrico, amônia e outros gases. Os lixiviados produzidos nessa fase apresentam grande quantidade de matéria orgânica (CASTILHOS,2003).

Na última fase, as bactérias metanogênicas (microrganismos estritamente anaeróbios), consomem os compostos orgânicos formados na fase anterior, dando origem a uma mistura de gases: gás metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2), e outros componentes em pequena proporção. Com o consumo dos ácidos voláteis, o valor do pH do meio volta a subir, e estando próximo ao neutro reduz-se a solubilização de compostos inorgânicos presentes, diminuindo a condutividade dos lixiviados (CASTILHOS,2003).

Segundo Castilhos (2003) nesta última fase, o lixiviado é considerado estável, com baixa DBO, resultando em menor capacidade de biodegradação dos lixiviados (relação DBO/DQO), em função do acúmulo de substâncias de difícil degradação biológica, como é o caso dos ácidos fúlvicos e húmicos, originários da decomposição de material vegetal.

A captação do lixiviado nos aterros sanitários é feita por drenos, com o intuito de impedir a passagem do mesmo para o solo, impedindo o contato com o lençol freático, minimizando os riscos de contaminação do meio ambiente e saúde pública. Posteriormente, deve ser tratado em estações de tratamento de efluentes, ou pode ser transportado, em caminhões, para Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs).

Segundo Santos (2011), alguns estudos com diferentes bioensaios (ensaio biológico que investiga os efeitos de uma substância em um órgão isolado ou em um organismo) confirmam o potencial perigo de lixiviação, pois o lixiviado produzido pode contaminar severamente águas subterrâneas e superficiais pela presença de alguns compostos químicos que causam toxicidade aos organismos expostos.

2.2.1. Composição dos lixiviados

Em diversos estudos, parâmetros físico-químicos e biológicos são utilizados para determinar a composição, controle e descarga do lixiviado nos corpos receptores. A composição depende de diversos fatores como o tipo de resíduo aterrado, o grau de decomposição, das condições climáticas, da estação do ano em que foram coletadas, da idade do aterro, profundidade do resíduo enterrado, tipo de operação do aterro, dentre outros fatores (GOMES, 2009). No entanto, as características dos resíduos e sua decomposição são mais influenciáveis na composição dos lixiviados (GOMES, 2009).

Como já mencionado, a decomposição dos resíduos se dá em várias etapas e, ao longo desse processo a concentração de íons de hidrogênio é variada, e, portanto, apresenta valores de pH diferentes em relação a idade do aterro (CASTILHOS,2003). A duração dessas etapas é diretamente proporcional a quantidade de oxigênio disponível para que os microrganismos degradem a matéria orgânica e, assim como o pH, outros parâmetros físico-químicos como a DBO, DQO, amônia, condutividade, dentre outros, também variam em função da idade do aterro (CASTILHOS,2003).

Quantidades significantes de matéria orgânica dissolvida podem estar presentes no lixiviado, e como consequência, altos valores de DBO e DQO são encontrados. A relação DBO/DQO tem sido usada como um indicador do nível de degradação biológica do lixiviado, mesmo apresentando limitações (GOMES, 2009). Em lixiviados jovens essa relação varia entre 0,5 e 0,8, tendo uma fração considerável da DQO equivalente aos ácidos graxos voláteis, já em aterros antigos, variam entre 0,04 a 0,08, pois grande parte dos compostos biodegradáveis já foram degradados (GOMES, 2009). Diferentemente do nitrogênio amoniacal, formado ao longo do processo de decomposição dos resíduos sólidos, que tende a se acumular com o tempo e não é facilmente removido, por ser estável em condições anaeróbicas (CASTRILLÓN et al., 2010).

Todos os contaminantes presentes nos lixiviados, exceto gases dissolvidos, contribuem para a concentração de sólidos (GOMES, 2009). É a presença de sólidos suspensos que leva a um aumento da turbidez, causando interferência na determinação da cor, por isso são feitas análises em amostras, determinando a cor real e aparente (PROSAB, 2009).

Segundo Zumach (2003), a cor característica do lixiviado é devido a decomposição da matéria orgânica presente nos resíduos, derivado de metais e principalmente ácidos húmicos.

Valores de alcalinidade também estão associados a decomposição da matéria orgânica e por isso, apresentam altos valores em lixiviados (MORAES, 2008).

O fósforo é um nutriente consumido em função do crescimento de microrganismos associados à produção de ácidos (POHLAND e HARPER, 1986 apud SANTOS, 2011), e como visto na literatura é encontrado na composição da maioria dos lixiviados de aterros sanitários.

Segundo Gomes (2009), cloretos resultam da dissociação dos sais, e de acordo com Bilgili et al. (2006) apud GOMES (2009), a concentração de cloreto não sofre alterações ao longo de algumas fases de decomposição dos resíduos nos aterros, mas é esperado que sua concentração diminua lentamente com o passar do tempo.

Na Tabela 1, são apresentadas as faixas máxima e mais provável de alguns parâmetros físico-químicos determinados em aterros sanitários no Brasil.

Tabela 1: Variação das características de lixiviados gerados em aterros sanitários brasileiros.

Parâmetros	Faixa máxima	Faixa mais provável
pH	5,7 - 8,6	7,2 - 8,6
Alcalinidade total (mg/L)	750 - 11.400	750 - 7.100
Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	2.950 - 25.000	2.950 - 17.660
DQO (mg/L)	190 - 80.000	190 - 22.300
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	0,4 - 3.000	0,4 - 1.800
Nrito (mg/L)	0 - 50	0 - 15
Nitrato (mg/L)	0 - 11	0 - 3,5
Fósforo total (mg/L)	0,1 - 40	0,1 - 15
Cloretos (mg/L)	500 - 5.200	500 - 3.000

Fonte: Adaptado de REIS, 2014.

2.2.1.1. Presença de substâncias húmicas no lixiviado

A matéria orgânica pode ser entendida como um sistema complexo de várias substâncias de natureza diversa, e que está em transformação contínua, devido a ação de fatores químicos, físicos, biológicos e inerentes ao solo e ao clima (STEVENSON, 1994 apud

MORAVIA, 2010). O material resultante dessa transformação é dividido em dois grandes grupos: substâncias não húmicas (SNH) e substâncias húmicas (SH), de coloração amarelo amarronzado e com elevada massa molar (STEVENSON, 1994 apud MORAVIA, 2010).

O grupo formado pelas SNH engloba aminoácidos, proteínas, ácidos graxos, dentre outros compostos orgânicos. As substâncias SH são formadas durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais, por reações de oxidação e subsequente polimerização da matéria orgânica (STEVENSON, 1994 apud MORAVIA, 2010).

Segundo Rosa (1998) as SH são divididas em três frações quando fracionadas em função de sua solubilidade em meio aquoso:

- Ácido Fúlvico (AF): fração solúvel em meio alcalino e ácido;
- Ácido Húmico (AH): fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido ($\text{pH} < 2$); e
- Humina: fração insolúvel em qualquer pH.

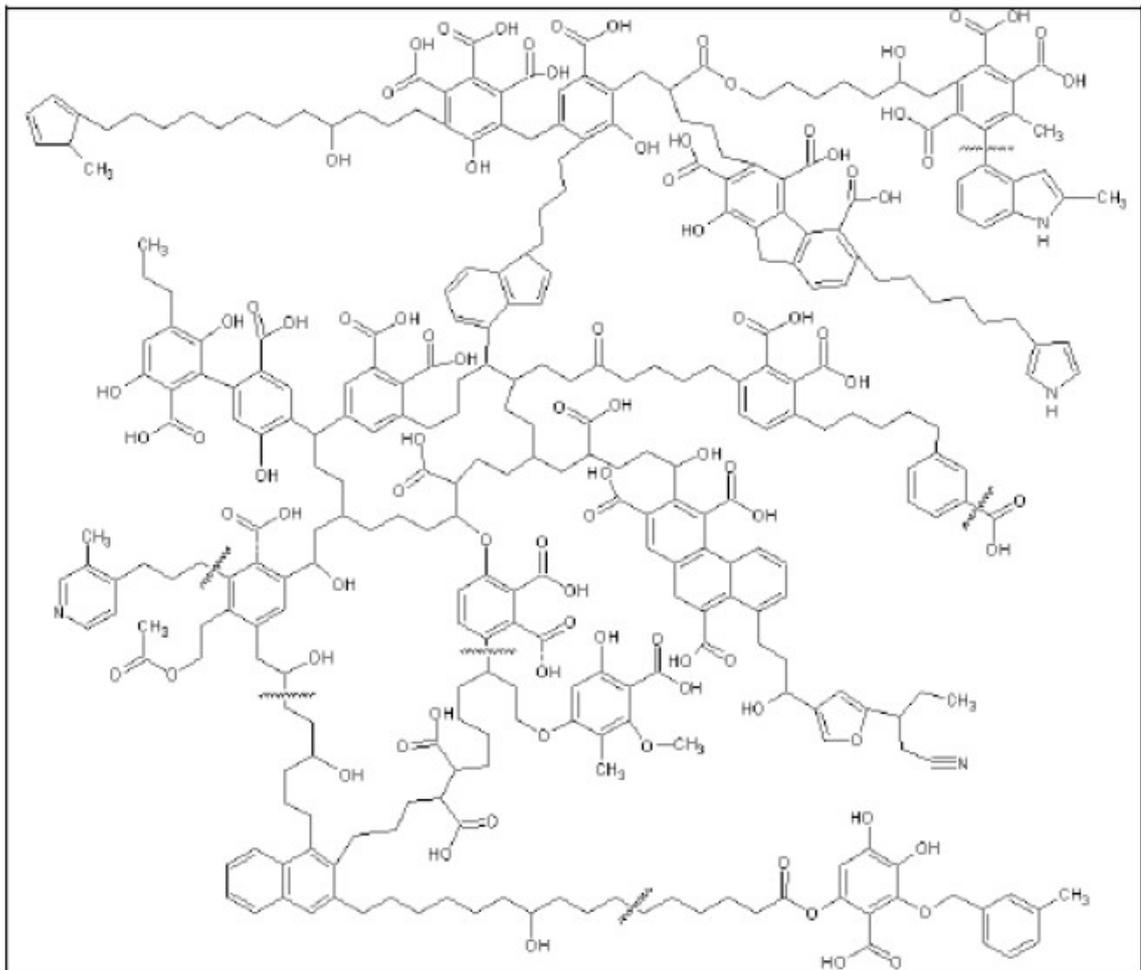
Estas frações são semelhantes a nível estrutural, mas possuem massa molar e quantidade de grupos funcionais diferentes (ROSA, 1998). Segundo Mc Bride (1994) a massa molar das frações de SH são definidas com massa molar: entre 640-5.000 Daltons (Da) para as frações fúlvicas, entre 10.000-100.000 Da para os ácidos húmicos e maiores que 100.000 para a fração humina.

Christensen et al. (1998) analisaram a matéria orgânica dissolvida em amostras de águas subterrâneas poluídas por lixiviado de aterro. Da amostra, frações de ácido húmico e fúlvico, foram isoladas e purificadas, determinando, dessa forma, a porcentagem de cada fração na amostra que foram 60% e 10%, respectivamente. Fan et al. (2006) também investigaram a presença de substâncias húmicas em diferentes lixiviados e verificaram que a concentração máxima, dada em porcentagem, para as amostras foi de 28% de AH e 30% AF.

Em pesquisa realizada por Moravia (2010), o autor cita a afirmação feita por alguns autores de que a recalcitrância em amostras de lixiviado está associada a presença de substâncias de elevada massa molar, com estruturas complexas (Figura 2 e 3), como é o caso das substâncias húmicas. Segundo Lu et al. (2008) e SIR et al. (2012) a matéria orgânica dissolvida no lixiviado é composta por ácidos graxos voláteis e SH. E, ainda de acordo com SIR et al. (2012) em aterros jovens são observadas maior presença dos ácidos graxos voláteis,

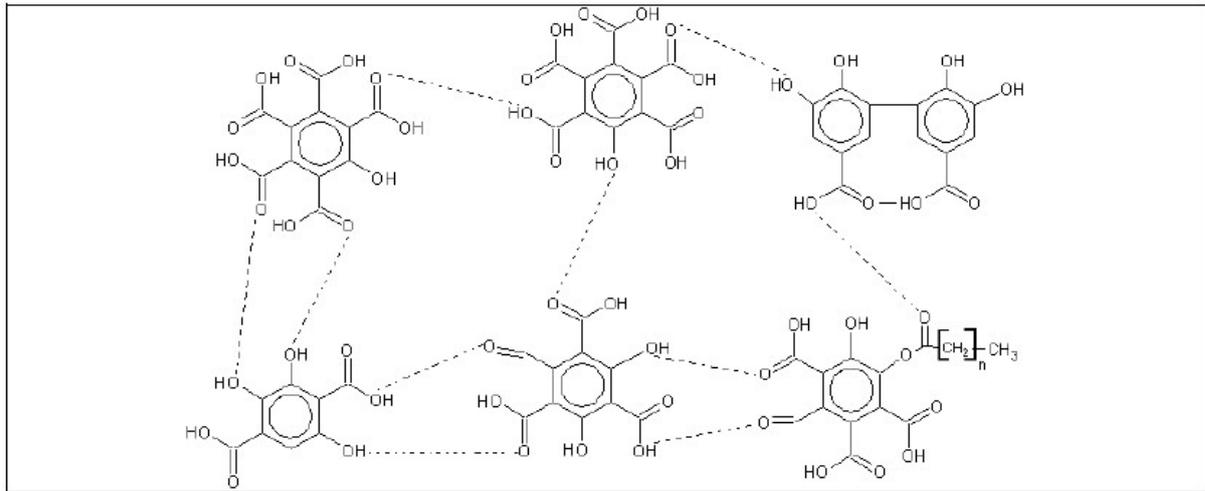
diferentemente de aterros mais antigos, onde são encontrados ácido húmicos e fúlvicos em maiores quantidades.

Figura 2: Estrutura hipotética para os ácidos húmicos.



Fonte: SCHULTEN e SCHNITZER, 1993 apud MORAVIA, 2010.

Figura 3: Estrutura hipotética para os ácidos fúlvicos.



Fonte: (SCHNITZER, 1978 apud MORAVIA, 2010).

Das metodologias existentes na determinação de SH são destacadas as que usam resinas e cromatografia líquida de alta eficiência, métodos estes que necessitam de extração da amostra antes da quantificação das SH, e, os métodos de Lowry e Sheng modificados, utilizados apenas para quantificar as SH presentes na amostra (MAIA, 2014).

2.3. Desreguladores endócrinos

O modo de vida da população não leva em conta o meio ambiente, e como consequências surgem problemas ambientais praticamente irreversíveis com o passar do tempo, dando destaque para o uso desenfreado de produtos orgânicos tóxicos na agricultura, agropecuária, indústria e em centros urbanos. Compostos orgânicos tóxicos estão presentes nos lixiviados, podendo causar sérios problemas ao meio ambiente e à população, como os desreguladores endócrinos (DEs), fármacos e poluentes orgânicos persistentes (POPs) (BILA, 2005).

O termo “Desreguladores Endócrinos” (DEs) é usado para definir as substâncias químicas presentes no meio ambiente, em concentrações baixíssimas na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L , que podem afetar o sistema endócrino dos seres humanos e animais. Substâncias essas, atualmente muito discutidas na literatura, uma vez que, podem causar efeitos adversos

também ao meio ambiente, gerando efeitos tóxicos a diversos organismos, no entanto, essa classe de compostos ainda não foi incluída na legislação ambiental de muitos países (BILA, 2005; PETROVIC e BARCELÓ, 2006).

Os desreguladores endócrinos são também conhecidos por interferentes endócrinos, disruptores ou disruptivos endócrinos, estrogênios ambientais dentre outros (GHISELLI e JARDIM, 2007). Segundo Bila e Dezotti (2003) os desreguladores podem ser encontrados em diversos ambientes águas superficiais, solo, sedimentos marinhos, em estações de tratamento de esgoto (ETE), dentre outros, bem como em lixiviado de RSU.

A ação dos DEs, pode alterar a função e danificar um órgão endócrino; interagir com um receptor de hormônios; ou alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino ou de forma periférica (EC, 2001). Alguns efeitos relatados na literatura foram feminização de peixes machos e problemas no sistema reprodutivo de diversos animais, gerando diminuição no tamanho da população a níveis significantes, podendo causar extinção, como também, mudanças no sistema imunológico de mamíferos marinhos, incidência de câncer e redução da quantidade de espermatozoides, dentre outros (BILA e DEZOTTI, 2007).

Substâncias consideradas DEs (Tabela 2) podem ser de origem antrópica, denominada xenoestrogênios, ou de origem natural. Como substâncias sintéticas, por exemplo, são destacadas: substâncias usadas na agricultura e seus sub-produtos - pesticidas, herbicidas e fungicidas; substâncias usadas nas indústrias e seus sub-produtos – dioxinas, PCB, alquilfenóis e seus subprodutos, HAP, ftalatos, bisfenol A (BPA) e metais pesados; compostos farmacêuticos – estrogênios sintéticos como o DES e 17α -etinilestradiol. E, como substâncias naturais, tem-se os fitoestrogênios, como por exemplo, genisteína, metaresinol e estrogênios naturais - 17β -estradiol, estrona e estriol (BILA e DEZOTTI, 2007).

Tabela 2: Compostos classificados como DEs.

Ftalatos	Pesticidas	
Dietilftalato (DEP)	<u>Inseticidas</u>	<u>Fungicidas</u>
di-iso-butilftalato (DIBP)	2,2 bis-p-clorofenil-,1, 1,1-	Vinclozolina
di-n-butilftalato (DBP)	tricloroetano (DDT)	Tridemorfos
butilbenzilftalato (BBP)	2,2 bis-p-clorofenil-1,	Carbendazime
dicicloexiloftalato (DCHP)	1-dicloroetileno (DDE)	Penconazol
di-2-(2-etil-exil)ftalato (DEHP)	Lindane (1,2,3,4,5,6-	Procloraz
di-n-octilftalato (DOP)	hexacloroexano)	Procimidona
di-isooctilftalato (DIOP)	Deltametrin	Epoxiconazol
di-iso-nonilftalato (DINP)	Carbofurano	Propiconazol
di-iso-decilftalato (DIDP)	<u>Herbicidas</u>	
	Atrazina	
	Linuron	
Alquilfenóis	Organoclorados	
Nonilfenol (NF)	Dibenzo-p-dioxina	
Octilfenol (OF)	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD)	
Nonilfenoletoxilado	2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (TCDF)	
Octilfenoletoxilado		
Compostos orgânicos de estanho	Agentes terapêuticos e farmacêuticos	
Tributilestanho (TBT)	Dietilestilbestrol (DES)	
Trifenilestanho (TPT)	17 α -etinilestradiol (EE ₂)	
Parabenos	Policlorados de bifenilas	
Benzilparabeno	2,4,4'-triclorobifenil	
Butilparabeno	2,2',5,5'-tetraclorobifenol	
Etilparabeno	2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil	
Isobutilparabeno	2,3',4,4', 5-pentaclorobifenil	
n-propilparabeno	2, 2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil	
metilparabeno	2,2',4,4',5, 5'-hexaclorobifenil	
	2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil	
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Retardantes de chama bromados	
Naftaleno	Polibromobifenila (PBB)	
Acenaftileno	2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47)	
Acenafteno	2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE99)	
Fluoreno	2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE100)	
Fenantreno	2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE 153)	
Antraceno	2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154)	
Fluoranteno	2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter	
Pireno	Octabromodifenil éter (BDE octa)	
Benzo[a]antraceno	Hexabromociclododecano (HBCD)	
Benzo[b]fluoranteno	Tetrabromobisfenol A (TBBA)	
Benzo[k]fluoranteno	Bisfenol	
Benzo[a]pireno	Bisfenol A	
Indeno[123-cd]pireno	Estrogênios naturais	
Dibenzo[ah]antraceno	Estrona (E ₁)	
Benzo[ghi]perileno	17 β -estradiol (E ₂)	
Metais pesados	Fitoestrógenos	
Mercúrio	<u>Isoflavona</u>	
Cádmio	daidzeína e genisteína	
Chumbo	<u>Lignanas</u>	
Zinco	metaresinol e enterodiol	

Fonte: BILA e DEZOTTI (2007)

O sistema endócrino é formado por várias glândulas localizadas em diferentes regiões do corpo, como exemplo, pode ser citado a tireoide e as glândulas supra-renais. As glândulas endócrinas produzem e secretam substâncias químicas que são lançadas na corrente sanguínea, controlando as funções biológicas como um todo, denominadas hormônios. A tiroxina, os estrogênios e progestagênios, a testosterona e a adrenalina são exemplos de hormônios sintetizados pelas glândulas. Algumas das funções controladas por hormônios são: atividades de órgãos completos, níveis de sais, açúcares e líquidos no sangue, crescimento e desenvolvimento de um determinado organismo, sua reprodução e características sexuais (GHISELLI e JARDIM, 2007).

A presença dos DEs no sistema endócrino ocorre quando estes se ligam a receptores hormonais, modificando sua resposta natural. Em função desta resposta, a substância que se liga ao receptor pode ser classificada como agonistas ou antagonistas. Esses compostos são considerados agonistas quando mimetizam um determinado hormônio, ou seja, atuam como se fossem o composto ligante natural e geram uma resposta, enquanto, compostos antagonistas não induzem respostas, apenas bloqueiam a ação do hormônio (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Na Figura 4 pode ser observado o mecanismo de atuação dos DEs, onde é demonstrado em (a) a ligação perfeita do hormônio a um receptor específico, transmitindo sinais fundamentais as células, (b) a presença de algum DE interagindo com o receptor hormonal e enviando sinais diferentes em relação a resposta natural e (c) o bloqueio da ação natural do hormônio na presença de um DE.

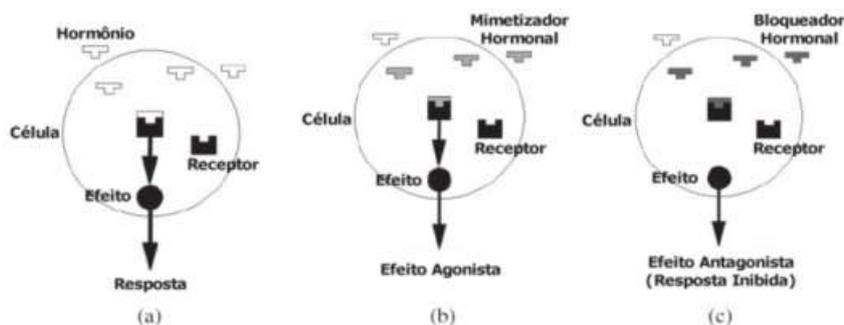
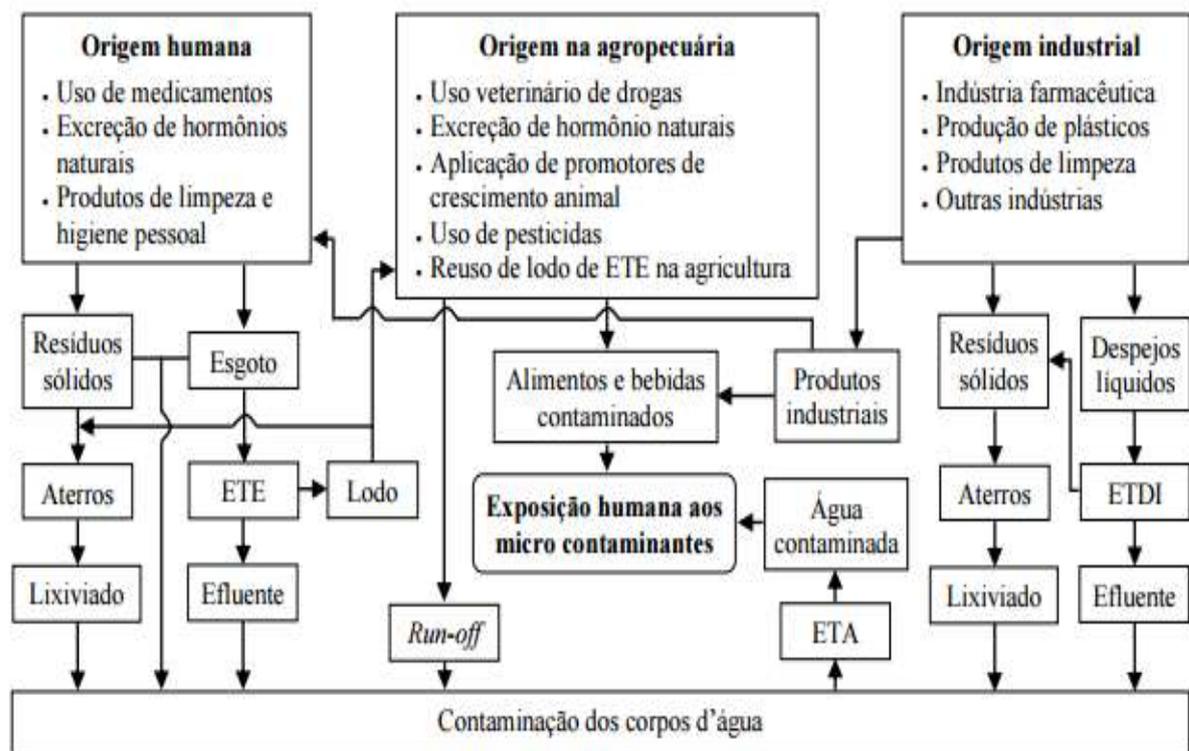


Figura 4: Mecanismos de atuação dos DEs.

Águas subterrâneas e superficiais podem ser contaminadas pela presença de DEs, como estrogênios naturais e sintéticos, ou por compostos xenobióticos provenientes principalmente do lançamento de esgoto tratado em mananciais, demonstrando a ineficiência dos tratamentos ou mesmo do esgoto não tratado, proveniente de fontes difusas, como também quando em contato com lixiviado de aterro sanitário (ZHANG et al., 2009; PESSOA et al., 2012). Estas e outras formas de contaminação dos corpos d'água podem ser observados na Figura 5.

Figura 5: Rotas de contaminação e exposição humana aos micropoluentes.



ETE = Estações de tratamento de esgoto; ETDI = Estação de tratamento de despejos industriais; ETA = Estação de tratamento de água. Fonte: BRANDT, 2012.

Segundo He et al. (2009) maior atenção tem sido dada aos desreguladores endócrinos presentes no lixiviado, e entre eles, os ésteres ftálicos (PAEs) e BPA. Esses autores investigaram a remoção desses poluentes por processo Fenton. Além disso, foi observado que a remoção foi mais eficiente em lixiviados antigos quando comparados aos novos, pois a

matéria orgânica dissolvida no lixiviado novo inibiu a remoção dos EDs, mais do que o lixiviado velho.

Asakura et al. (2004) também determinou PAES e BPA em concentrações consideráveis e praticamente constantes, independente da composição dos resíduos e em diversas épocas do ano, nas amostras analisadas de lixiviado. Quando analisado a influência da idade do aterro, a concentração do dietilftalato (DEP) (éster ftálico mais abundante encontrado no lixiviado de estudo) manteve-se constante, diferente do BPA que demonstrou a tendência de diminuição com o tempo. Alquilfenóis também foram determinados, porém em baixas concentrações similares as concentrações encontradas em águas superficiais e compostos organoestânicos não foram detectados (ASAKURA et al., 2004).

De acordo com Coors et al. (2003), a presença de xenoestrogênios como o BPA e nonilfenol tem sido bastante relatado na literatura em lixiviados de aterros sanitários, demonstrando que os DEs têm despertado preocupação no mundo devido seus efeitos deletérios sobre o ambiente e a saúde pública. No entanto, até o momento, não foram estabelecidos os limites de DEs na resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente em lançamento de efluentes e lixiviado quando misturados a esgoto bruto para tratamento combinado (CONAMA, 2011).

2.3.1. Atividade estrogênica

Alterações no sistema endócrino podem ser causadas pelos vários mecanismos de ação dos DEs quando presentes no sistema endócrino. Estas substâncias possuem a capacidade de produzir respostas biológicas similares as produzidas pelos estrogênios naturais, como por exemplo a atividade estrogênica. A atividade estrogênica é a capacidade de uma substância em ligar-se a um receptor de estrogênio e elucidar uma resposta (BILA, 2005).

A afinidade de ligação desses DEs no receptor de estrogênio (RE) tem sido avaliada em ensaios *in vitro* e *in vivo*, podendo ser mais forte ou mais fraca, dependendo das substâncias analisadas. O estrogênio padrão humano 17β -estradiol possui estrutura semelhante às substâncias consideradas estrogênicas, e por isso é usado como controle positivo em ensaio *in vitro*, avaliando a atividade estrogênica das mesmas (BILA, 2005).

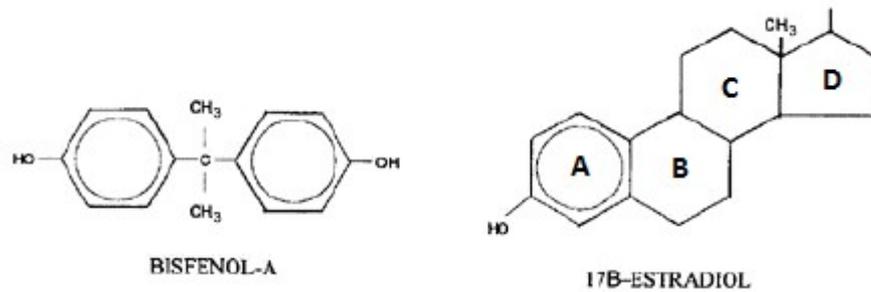
A característica principal que leva a investigação de determinadas substância, com suspeita de serem estrogênicas ou não, deve-se a estrutura similar com o anel fenólico do 17 β -estradiol (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* foram realizados por muitos pesquisadores, com o intuito de determinar a resposta estrogênica de uma substância ou amostra ambiental. Além disso, o ensaio *in vivo* pode ainda analisar os efeitos causados a organismos expostos a substância/amostra estudada (BILA, 2005).

Os DEs com atividades estrogênica podem ser divididos em dois grupos: estrogênios naturais e xenoestrogênios. Além dos estrogênios naturais estrona (E₁), 17 β -estradiol (E₂) e estriol (E₃), os fitoestrogênios também se encontram nesse grupo. No grupo dos xenoestrogênios, estão incluídos os fármacos dietilestilbestrol (DES) e o 17 α -etinilestradiol (EE₂), BPA, e outros produtos como pesticidas, produtos de degradação de surfactantes, dentre outros (BECK et al., 2006).

Hormônios conhecidos como esteróides exercem sua ação pela passagem através da membrana plasmática e acoplam-se a receptores intracelulares (Ying et al., 2002 apud Bila, 2005). Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), os hormônios esteroides possuem uma estrutura química básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si (A, B, C e D), estrutura conhecida como ciclo-pentano-peridrofenantreno. Estes hormônios são caracterizados pela presença do anel fenólico (A), que possui um grupamento hidroxila no carbono 3, por onde ocorre a ligação aos receptores de estrogênios (BILA, 2005). Mas há também DEs como o BPA que apresentam atividade estrogênica, interagindo com o hormônio feminino estrógeno, mesmo apresentando diferenças estruturais significativas como demonstrado na Figura 6.

Figura 6: Diferença na estrutura do BPA e dos hormônios estrógenos.



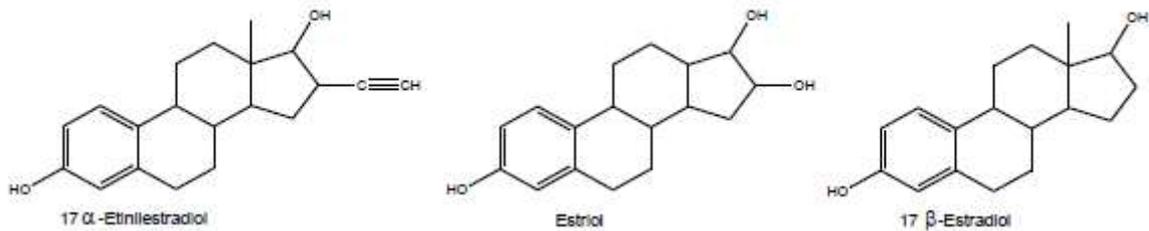
Fonte: Adaptado de GOLOUBKOVA e SPRITZER (2000) apud MONTAGNER (2013).

Segundo Gould et al.,1998, a partir de estudos com ensaios *in vitro*, o BPA demonstrou atividade estrogênica de 1.000 a 1.500 vezes menor que o estradiol e o estriol. O BPA atua como agonista, mimetizando o estradiol e ligando-se tanto ao receptor de estrogênio α como ao β (MILLIGAN e BALASUBRAMANIAN, 1998; KUIPER et al., 1998 apud MONTAGNER, 2013).

Uma vez que os hormônios E₃, E₂ e EE₂ e o BPA são os DEs de estudos no presente trabalho, são apresentadas alguns de seus usos no ambiente. O BPA é extensamente usado na produção de plásticos, principalmente os policarbonatos e resinas epóxi. São usados também na fabricação de revestimentos, produção de PVC, fabricação de pneus, dentre outros. O policarbonato produzido, por exemplo, é usado em CDs e DVDs, equipamentos eletrônicos, recipientes de alimentos e bebidas (BISPHENOL A, 2016).

Os estrogênios estudados apresentam pouco diferença em suas estruturas químicas (Figura 7). Os estrogênios naturais podem ser encontrados em diversas matrizes ambientais, e são excretados naturalmente na urina humana. Já o hormônio sintético, 17 β -etnilestradiol é usado como contraceptivo oral, na reposição terapêutica na menopausa ou na prevenção do aborto.

Figura 7: Estrutura química de estrogênios naturais (E_2 e E_3) e sintéticos (EE_2).



Fonte: Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007.

2.3.2. Desreguladores endócrinos: Métodos de determinação em amostras ambientais

Dentre os métodos de extração mais empregados, podem ser destacadas a Extração em Fase Sólida (EFS), Extração Líquido-Líquido (ELL) e a Micro Extração em Fase Sólida (MEFS), que são métodos de preparação para isolar e concentrar analitos, em diversos tipos de matrizes ambientais.

As etapas de extração e concentração do composto de interesse precedem a quantificação, determinada por técnicas de separação, com destaque para a Cromatografia a gás (CG) e a Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em amostras ambientais. E, assim como nas análises cromatográficas, as amostras analisadas no ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*) também precisam ser concentradas pela EFS, que será comentado mais adiante. Essa etapa torna-se necessária para que essas substâncias sejam quantificadas mesmo presentes em baixíssimas concentrações em amostras ambientais ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}).

A princípio, dependendo da matriz analisada, a EFS é uma técnica que necessita de grandes volumes de amostra para concentração dos analitos, no entanto, possui vantagem em relação a extração líquido-líquido (ELL) para análise dos mesmos, devido ao alto consumo de solventes orgânicos na ELL e, por possuir um procedimento de análise extenso, composto por várias etapas que podem causar a perda do analito, conferindo menos precisão ao resultado final (XIANGLI et al., 2006).

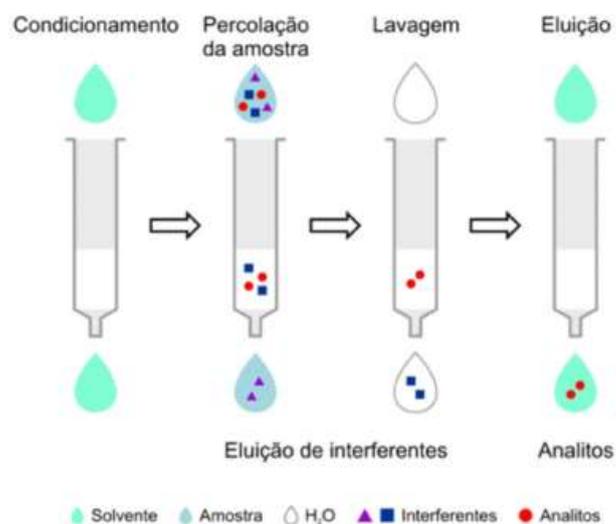
2.3.2.1. Extração em fase sólida (EFS)

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido usualmente empregada com o propósito de isolar e concentrar analitos presentes em uma matriz. Como os compostos estão presentes em níveis muito baixos para uma quantificação exata e precisa, é necessário a EFS para o enriquecimento de analitos de interesse evitando concentrar os interferentes (CALDAS et al., 2011).

Para isolamento e concentração dos analitos, são comumente usados cartuchos contendo um sorvente específico, onde os analitos serão removidos ao final da EFS com um solvente orgânico adequado, e, em função disso, antes da escolha do cartucho e solventes usados na ativação do cartucho e eluição dos analitos, deve-se conhecer as características físico-químicas da amostra a ser estudada, assim como, informações sobre o analito de interesse e interferentes que precisam ser removidas (CALDAS et al., 2011).

As etapas da extração resumem-se no condicionamento do cartucho para a ativação do sorvente; na percolação da amostra pelo cartucho, no qual, ocorre sorção dos analitos no sorvente; no clean up, ou seja, remoção dos interferentes presentes na matriz de estudo; e eluição dos analitos para concentração do(s) composto(s) de interesse após secagem. As etapas envolvidas na EFS estão ilustradas na Figura 8.

Figura 8: Etapas envolvidas na EFS.



Fonte: CALDAS et al.,2011

Na etapa de condicionamento, o solvente a ser utilizado dependerá principalmente do material a ser ativado. Em análises ambientais, o uso de sorventes hidrofóbicos não seletivos, como C18, por exemplo, são muito empregados, por sua capacidade de remoção de compostos interferentes de análises cromatográficas (TRAN et al., 2007).

Na passagem de certo volume de amostra pelo cartucho, o pH da amostra torna-se fundamental para que haja a estabilização e retenção mais eficiente do analito em questão devido a interação mais forte dos íons não dissociados (CALDAS et al., 2011), uma vez que, a acidificação diminui a dissociação de analitos pouco ácidos. No entanto, há divergências sobre a importância da acidificação da amostra, mas de acordo com estudo realizado por Pessoa et al. (2012), em relação ao efeito do pH na matriz, a extração dos analitos E₁, E₂, EE₂ e E₃ após mudança do pH original, tornou a extração muito mais eficiente, possibilitando a determinação do hormônio E₂ na amostra e aumentando a concentração do EE₂ em 6 vezes, através da cromatografia gasosa.

Em qualquer matriz estudada, há um interesse específico em um ou mais compostos, porém, estarão presentes outros compostos que não são importantes para o estudo em si, necessitando a remoção destes, que podem vir a interferir no método. Para esta etapa de limpeza, conhecida como *clean up*, são utilizados solventes com força de eluição intermediária, que não possuem força para remover o analito de interesse, denominados “solventes de lavagem”. Quando o composto fica retido no cartucho, faz-se a etapa de eluição, com o solvente adequado, relacionado com a polaridade da substância analisada e do sorvente usado, evitando a eluição de interferentes que não tenham sido removidos na etapa anterior (CALDAS et al., 2011). É usado um solvente volátil na etapa de eluição, concentrando o analito e depois sendo facilmente evaporado. O extrato, logo em seguida, é ressuspensionado em um pequeno volume de solvente, adequado para a análise posterior (JARDIM, 2010).

Os cartuchos usados em EFS são comercializados com diferentes sorventes e em quantidades diferentes, dependendo das características da amostra, sua complexidade e do que se pretende analisar, além de diversos volumes (CALDAS et al., 2011), conforme observado na Tabela 3.

Tabela 3: Guia de seleção de sorventes utilizados em cartuchos em função do analito de interesse.

Mecanismo	Sorvente	Tipo de analito
Apolar (fase reversa) partição e adsorção	C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, polimérico	Grupos funcionais apolares como alquilas e aromáticos
Polar (fase normal) partição e adsorção	Sílica, diol, ciano, aminopropil, diamino	Grupos funcionais polares como aminas e hidroxilas
Troca catiônica	forte (ácido sulfônico) ou fraco (ácido carboxílico)	Grupos funcionais carregados positivamente como aminas
Troca aniônica	forte (tetra alquilamônio) ou fraco (amino)	Grupos funcionais carregados negativamente como ácidos orgânicos

Fonte: JARDIM, 2010.

2.3.2.2. Determinação e quantificação dos DEs: CLAE

A cromatografia é um método analítico baseado na separação dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis: uma fase móvel (eluente) e outra fase estacionária (adsorvente), podendo ser usada na identificação de compostos (usando padrões) bem como na purificação de compostos, separando-os de substâncias indesejáveis (DEGANI, 1998). A separação das espécies químicas presentes nas amostras ocorre por um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto e as fases móvel e estacionária (CHUST^a, 1990).

As diferentes formas de análise usando cromatografia são classificadas em função de critérios como:

- Tipo de suporte: coluna ou planar;
- Modo de operação (adsorção, partição, permuta iônica, exclusão de tamanhos ou afinidade);
- Natureza da fase móvel: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL) ou cromatografia supercrítica (CSF);
- Objetivo de separação: analítica ou preparativa (produção/purificação);

- Composição da fase móvel: isocrática (composição constante) ou gradiente (composição variável); e
- Modo de operação: análise frontal, análise por deslocamento e eluição.

A CLAE se diferencia basicamente da cromatografia líquida clássica (CLC) pela utilização de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel, em função da sua baixa permeabilidade, uma vez que a fase móvel na CLC é arrastada através da coluna apenas pela força gravitacional.

A fase estacionária é referente a coluna cromatográfica, no qual é formado por um cilindro constituído por um material de enchimento formado por pequenas partículas, e, a fase móvel é referente aos solventes usados para levar a amostra injetada pela coluna e pelo detector (CHUST^a, 1990). As variadas combinações entre as duas fases é o que torna a técnica bastante flexível e de grande aplicação (DEGANI, 1998).

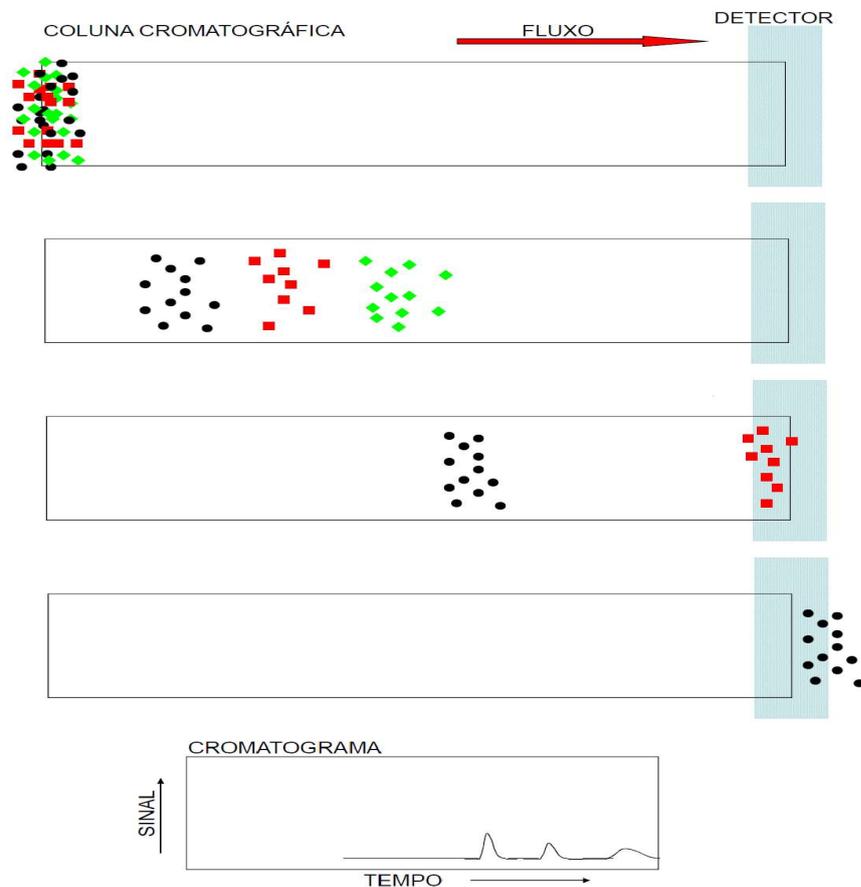
O extrato obtido na EFS de cada amostra é ressuspenso em solvente e então, introduzido na coluna cromatográfica. A fase móvel é bombeada e desloca os componentes presentes na amostra através da coluna, que se distribuem entre as fases móvel e estacionária, de acordo com as suas afinidades. As substâncias com maior afinidade com a fase estacionária, movem-se lentamente, enquanto as com pouca afinidade com a mesma, movem-se rapidamente. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico, o qual é registrado e constitui um cromatograma, como pode ser observado na Figura 9 (ARGENTON, 2010).

Para a quantificação de um ou mais componentes presentes em uma amostra, é necessário o emprego de um método analítico adequado no cromatógrafo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto de Metrologia (INMETRO) são órgãos que disponibilizam regras para a validação de métodos analíticos para CG e CLAE. (ANVISA, 2013; INMETRO, 2010) Dos itens dispostos, podem ser destacados os seguintes parâmetros de desempenho analítico (RIBANI et al., 2004):

- Especificidade/Seletividade: É a capacidade de avaliar uma substância mesmo com presença de interferentes.
- Precisão: avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra;

- Recuperação: É a quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada a matriz, que após extração pode ser quantificada, dada em porcentagem.
- Robustez: medida da capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos;
- Linearidade: capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse numa determinada faixa de aplicação;
- Limite de Detecção (LD): menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada; e
- Limite de Quantificação (LQ): menor concentração da substância de interesse que pode ser medida.

Figura 9: Esquema demonstrativo da separação dos componentes de uma mistura até a formação de picos cromatográficos usando CLAE.



Fonte: Adaptado de ARGENTON, 2010.

2.3.2.3. Atividade estrogênica: ensaio *in vitro* YES

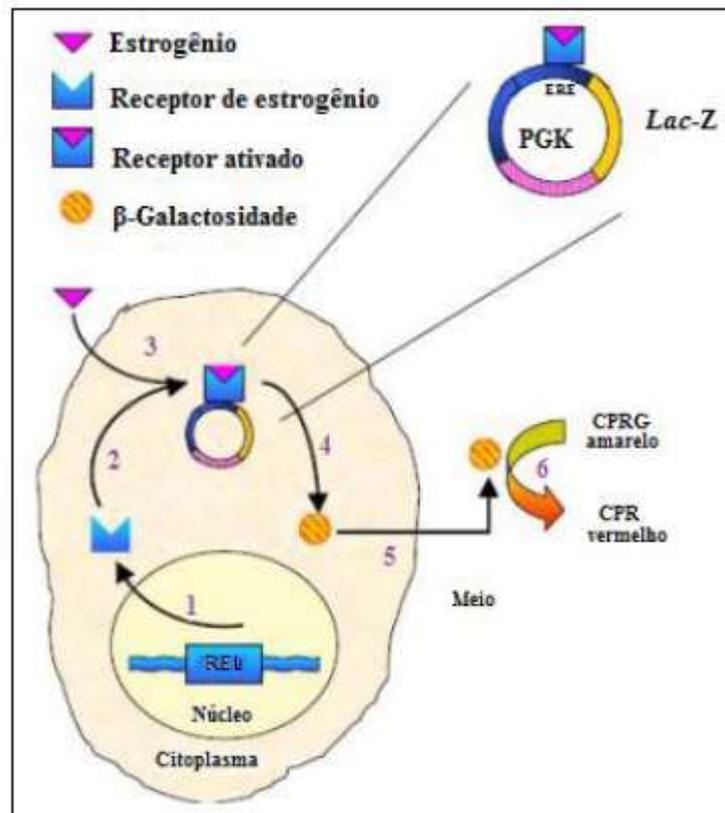
Os ensaios *in vitro* são importantes na identificação e quantificação de atividade estrogênica em uma substância/amostra ambiental e se baseiam em mecanismos de ação específicos dos DEs.

Neste estudo, foi utilizado o ensaio *in vitro* YES que utiliza um gene repórter em célula de levedura contendo receptor de estrogênio humano (REh), onde o gene repórter codifica a β -galactosidase. A levedura usada no ensaio é a *Saccharomyces cerevisiae* e a cepa foi construída por técnicas de engenharia genética (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

Inicialmente a sequência de DNA do receptor de estrogênio humano é inserida no genoma da levedura, sob a indução do gene repórter Lac-Z. Em seguida, caso contenha substâncias estrogênicas na amostra analisada, há interação da mesma com o receptor hormonal, que se converte em um receptor ativo, induzindo a expressão da enzima β -galactosidase, liberando-a no meio. A produção da β -galactosidase que metaboliza o substrato cromogênico clorofenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) no meio, depende da quantidade de substância estrogênica presente. O substrato cromogênico CPRG é degradado pela enzima até o momento em que a coloração do meio muda de amarelo para vermelho, indicando presença de atividade estrogênica (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

Na Figura 10, foi esquematizado o sistema de expressão de atividade estrogênica no ensaio YES, onde cada número representa uma etapa do ensaio YES. Em 1 tem-se a forma capaz de acoplar-se aos elementos de respostas de estrogênios (ERE); 2 e 3 a ativação do receptor hormonal pela interação com o estrogênio, causando expressão do gene receptor da Lac-Z; 4 a produção da enzima β -galactosidase e consequente excreção do meio; 5 e 6 a enzima metaboliza o substrato cromogênico CPRG, modificando a coloração do meio.

Figura 10: Esquema do sistema de expressão de atividade estrogênica em ensaio YES utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996.

No ensaio YES a atividade estrogênica não leva em consideração um composto de forma isolada responsável por essa resposta. A atividade resultante de cada amostra é comparada com a atividade do estrogênio 17β -estradiol, podendo ser expressa, portanto, em equivalente estradiol (Eq-E₂) (BILA, 2005). É um ensaio que possui alta sensibilidade e a presença de interferentes externos podem afetar o ensaio negativamente (SILVA, 2015).

2.4. Ecotoxicidade

O uso de ensaios ecotoxicológicos integra os conceitos da Ecologia e da Toxicologia, ou seja, abrange uma diversidade de organismos e os mais variados efeitos de uma ou mais substâncias tóxicas sobre uma população ou comunidade de organismos. É a ciência que estuda as diversas formas de contaminação do ambiente por poluentes, pela ação antrópica,

avaliando danos em ecossistemas variados após contaminação, sendo capaz de prever danos futuros em lançamentos de despejos num determinado ambiente, por exemplo (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Portanto, a análise ecotoxicológica tem por objetivo, reconhecer que tipo de amostras apresentam substâncias químicas que atuam isoladamente ou em conjunto com outras substâncias, tornando-se nocivas para os organismos-teste, em quais concentrações e como manifestam seus efeitos (REIS, 2014). A análise da toxicidade de uma amostra prevê os efeitos da mesma sobre os organismos, e por isso, ensaios de toxicidade tornam-se bastante importantes, à medida que, a aplicação de tratamentos de efluentes não leva a eliminação total dos compostos nocivos, podendo causar letalidade ou efeitos anormais aos organismos expostos, além de fornecer mais informações em relação ao efluente quando comparado a testes físico-químicos (COSTA et al., 2008).

Na literatura, foram observadas a interação de substâncias que provocam efeitos sinérgicos, antagônicos, de adição e de potenciação de contaminantes sobre o ambiente, gerando questões complexas devido a resposta biológica quantitativamente e qualitativamente diferente quando comparada a ação das mesmas substâncias sozinhas. Segundo Zagatto e Bertolletti (2008) cada um destes efeitos podem ser definidos como: *Sinérgicos* - Quando a soma de dois ou mais contaminantes possui efeito maior que a soma dos mesmos contaminantes quando aplicados individualmente, *Antagônicos* - Quando a soma de dois ou mais contaminantes possui efeito menor que a soma dos mesmos contaminantes quando aplicados individualmente, *de adição* - Quando a soma de dois ou mais contaminantes é exatamente igual a soma dos contaminantes quando aplicados individualmente e *de potenciação* - Quando um contaminante tem efeito tóxico na presença de outro contaminante, sendo este tóxico ou não.

Os ensaios de toxicidade são classificados como agudos ou crônicos, e suas diferenças básicas são em relação ao tempo de duração do ensaio e suas respostas finais, expressas pela Concentração Letal Mediana (CL50) e/ou pela Concentração Efetiva Mediana (CE50), determinada por métodos estatísticos computacionais. As diferenças observadas entre essas duas respostas são em relação ao efeito medido em 50% dos organismos expostos, a uma concentração específica causando letalidade ou efeitos subletais. Os valores dessas respostas são expressos em relação a 50% dos organismos devido a obtenção de respostas mais reprodutíveis, com mais confiabilidade e mais significativas quando extrapoladas para uma

população. E, apresentam relação inversa com a toxicidade, ou seja, quanto maior a CE(L)50, menor será a toxicidade. E, ainda, a toxicidade pode ser expressada através do Fator de Toxicidade (FT) que é o menor valor de diluição da amostra na qual não se observa efeito tóxico sobre os organismos (REIS, 2014; COSTA et al., 2008; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Nos ensaios de toxicidade aguda são avaliados os efeitos sobre os organismos-teste, normalmente severos e rápidos, em um curto período de tempo, geralmente de 24 a 96h, em concentrações mais elevadas do agente tóxico quando comparado aos testes de toxicidade crônica. Nos testes de toxicidade aguda, o efeito medido é a letalidade ou ainda, efeitos subletais, como por exemplo, crescimento, alterações no metabolismo ou mobilidade. Em contrapartida, testes de toxicidade crônica, permitem avaliar diversos efeitos sobre os organismos expostos, porém não letais, em baixas concentrações do agente tóxico (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Os efeitos tóxicos sobre os organismos podem ser bem diversificados, como número de mortes, anomalias ou aparecimento de tumores, taxa de reprodução, comprimento e massa corporal, alterações fisiológicas, e até mesmo a densidade e diversidade de espécies na natureza (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Efeitos agudos gerados por substâncias tóxicas podem ser resultado de aplicações inadequadas de agrotóxicos, efluentes de diversas fontes, não tratados, são lançados aos corpos d'água, tratamento ineficiente de efluentes e acidentes ambientais (COSTA *et. al*, 2008).

2.4.1. Organismos-teste

Organismos-teste muito utilizados em testes ecotoxicológicos são provenientes de grupos representativos dos mais variados ecossistemas, como microrganismos, plantas, invertebrados e peixes. Na literatura, testes com algas, crustáceos e peixes são bastante corriqueiros, no entanto, testes com bactérias tornam-se bastante atrativos, pois, possuem menor duração no tempo de análise, simplicidade de operação, com menores volumes de amostra e alta reprodutibilidade e sensibilidade (CUNHA, 2011; COSTA et. al, 2008). Assim como sementes de plantas também tem se mostrado excelentes organismos para bioensaios de

toxicidade, apresentando ótimas respostas junto a baixo custo, eficiência e simplicidade de operação (CUNHA, 2011).

A legislação brasileira referente às condições de padrões de lançamento de efluentes, Resolução CONAMA nº 430 (Brasil, 2011) exige ensaios de toxicidade com pelo menos dois organismos de diferentes níveis tróficos, antes dos efluentes serem lançados nos rios, uma vez que, espécies de um mesmo grupo possuem sensibilidades parecidas.

2.4.1.1. *Lactuca sativa*

Lactuca sativa é o nome científico dado às sementes de alface (Figura 11) que atuam como produtores em uma cadeia alimentar. São organismos eucariontes, fotossintetizantes, componentes importantes nos diversos ecossistemas, e possuem alta sensibilidade a substâncias tóxicas. No entanto, a alta sensibilidade é adquirida quando as sementes são hidratadas e conseqüentemente rompem seu estado de dormência iniciando a fase de germinação, por isso, devem ser estocadas em ambiente seco (CUNHA, 2011).

Figura 11: Ilustração do organismo *Lactuca sativa*.



Ensaio utilizando sementes de alface avaliam efeitos tóxicos das amostras em relação a duas características: a germinação e crescimento da raiz das sementes, podendo apresentar, portanto, sensibilidade a diferentes compostos e concentrações. Além disso, podem ser aplicadas em diferentes matrizes: amostras líquidas como água, esgoto, lixiviado de RSU e de

resíduos industriais, dentre outros, ou amostras sólidas como solo contaminado (CUNHA, 2011).

Em estudo realizado por Klauck et al. (2015), a toxicidade foi analisada através do teste de germinação e crescimento radicular das sementes de alface, em amostras de lixiviado bruto, lixiviado tratado por processo biológico e controle negativo com água de abastecimento público. A exposição das sementes as amostras citadas demonstrou a presença de toxicidade mesmo após tratamento biológico e, o lixiviado bruto causou redução no crescimento radicular das sementes, quando comparado ao lixiviado tratado e controle negativo.

Cunha (2011) avaliou a toxicidade aguda, utilizando sementes de alface, em efluentes provenientes de um sistema piloto de tratamento de lixiviado e esgoto bruto construído dentro da estação de tratamento de esgoto sanitário da cidade de Canoas. A estação utiliza dois tipos de tratamento baseado em um sistema: aeróbio, no qual as bactérias crescem aderidas a *pall rings* e anaeróbio com biofilmes em *pallets*. Dessa forma, foram coletadas sete amostras em diferentes pontos: dois pontos na entrada do sistema (lixiviado de aterro sanitário e esgoto bruto), quatro pontos após a mistura das amostras, dois na entrada e na saída do reator 1 (sistema anaeróbio), e dois na entrada e na saída do reator 2 (sistema anaeróbio), e mais um ponto referente ao efluente que sai de um sistema com tampas de PET usadas como biofilme, denominado saída CBR, que tem por efluente de entrada a mistura resultante da saída do reator 2. As amostras de lixiviado analisadas apresentaram muita toxicidade as sementes, fazendo com que não germinassem. Já a amostra de esgoto bruto frente as sementes, gerou alta taxa de crescimento de suas raízes, em função da ligeira toxicidade, entretanto. Com a mistura dos efluentes, na entrada do reator 1 e 2, o crescimento foi muito baixo, demonstrando alta toxicidade. Em relação aos efluentes na saída dos reatores e a saída CBR, nenhum ensaio apresentou crescimento de raiz significativo.

2.4.1.2. *Daphnia simillis*

A *Daphnia simillis*, é um microcrustáceo de água doce que atua como consumidor primário na cadeia trófica. As espécies de *Daphnia similis* (Figura 12) têm de 0,5 a 5,0 mm de comprimento e uma carapaça bivalve transparente que encerra todo o corpo, com exceção da cabeça e antenas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Popularmente conhecida como pulga

d'água é um organismo muito utilizado em testes de toxicidade em diversas matrizes ambientais, devido sua disseminação nos corpos de água doce, além disso são fonte de alimentos para peixes, facilmente cultivados em laboratório e sensíveis a diversos contaminantes presentes no meio. Além disso, atende os critérios estabelecidos pelos procedimentos padrões para a seleção de espécies alternativas, mesmo não sendo uma espécie natural do Brasil. O efeito tóxico normalmente avaliado em testes com microcrustáceos é a imobilidade, devido a dificuldade de avaliação quanto a morte em função do tamanho desses organismos (COSTA et al., 2008).

Figura 12: Ilustração do organismo *Daphnia simillis* adulta.



Fonte: <http://www.killiadietos.com>

Sabendo que amostras de lixiviado de aterro sanitário normalmente são mais tóxicas comparadas a amostras de esgoto, Mannarino (2010) realizou um estudo com organismos *Daphnia simillis* de ensaios de toxicidade aguda em amostra proveniente de um tratamento combinado do esgoto doméstico com o lixiviado do aterro do Morro do Céu em Icarai. Deste estudo, foi concluído que a adição de lixiviado não tornou o efluente tratado mais tóxico que o esgoto puro, e, não houve redução significativa de toxicidade após tratamento na estação de tratamento de esgoto (ETE) para os microcrustáceos.

Araujo et al. (2010) avaliou a toxicidade aguda em *Daphnia simillis* utilizando lixiviados de diferentes origens. Os lixiviados estudados apresentaram uma CE(L)50 média de

7,5%, 4,2% e 29,6%, para o aterro controlado, aterro sanitário e lixão, respectivamente, demonstrando menor toxicidade para o lixiviado proveniente do lixão.

Magalhães (2012) avaliou o efeito da adição de lixiviado ao esgoto sanitário. Amostras de esgoto bruto, lixiviado, mistura esgoto-lixiviado afluente na ETE e efluente secundário obtido pelo tratamento por lodos ativados foram coletados e analisadas quanto à toxicidade aguda à *Daphnia simillis*. O esgoto bruto não apresentou toxicidade aguda para a *Daphnia simillis*, diferentemente do lixiviado, que apresentou alta toxicidade com valores de CE50 variando de 4 a 18%. A mistura lixiviado-esgoto preparada em laboratório apresentou maior toxicidade aguda que o próprio lixiviado, indicando um efeito de potenciação ao adicionar esgoto ao mesmo, e, as águas residuais tratadas apresentaram ligeira toxicidade.

2.4.1.3. *Danio rerio*

Danio rerio é vulgarmente conhecido como peixe paulistinha ou peixe zebra (zebrafish), e atua como consumidor secundário dentro da cadeia alimentar. É uma espécie ovípara nativa do sul dos países do sul da Ásia e habita em águas doces e paradas. O parâmetro avaliado nos testes de toxicidade aguda com peixes é a mortalidade. Adultos de *Danio rerio* (Figura 13) atingem comprimento médio de 4,5 cm e o sexo pode ser diferenciada pela cor levemente dourada presente nos organismos machos.

Figura 13: Ilustração do organismo *Danio rerio* adulto.



No estudo de Alves (2010), foi feita uma avaliação da sensibilidade relativa dos organismos em efluentes de diversas indústrias (alimentícia, bebidas, farmacêutica, papel e petroquímica), efluentes proveniente de decapagem de metais, e lixiviado de três aterros sanitários em locais diferentes (São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul). Em todos os aterros foram coletadas amostras de lixiviado bruto, clarificado, e, todas as amostras analisadas, mesmo após tratamento, apresentaram toxicidade aos organismos-teste. Dos lixivios analisados, como esperado, a maior toxicidade foi proveniente das amostras brutas, seguida das amostras clarificadas e tratadas, nessa ordem, porém com reduções de até 70,49% da toxicidade do lixiviado bruto para o tratado e os organismos do tipo *Danio rerio*, mostraram-se no geral mais sensíveis.

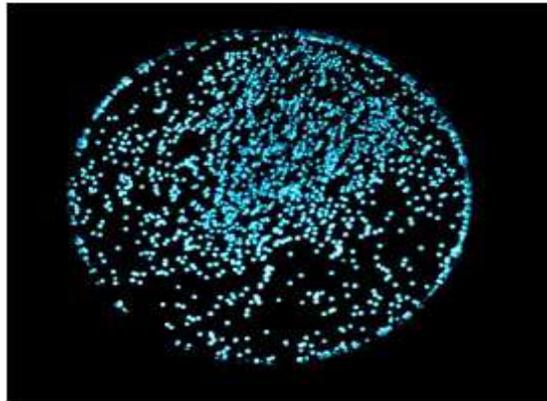
Em outro estudo, de acordo com Carneiro e Murad (2012), é destacado a importância do tratamento do lixiviado na redução do impacto provocado sobre os organismos aquáticos. Segundo os autores, esta redução é diretamente relacionada à manutenção e eficiência do tratamento proposto, principalmente à etapa de nanofiltração. Através de ensaios ecotoxicológicos, utilizando *Danio rerio*, foi percebido grande redução da toxicidade ao comparar o lixiviado bruto ao tratado.

Segundo Mannarino (2010), em estudo realizado com organismos *Danio rerio* através de ensaios de toxicidade aguda em amostra proveniente de tratamento combinado de esgoto doméstico e lixiviado de aterro sanitário em Icarai, o efluente apresentou toxicidade reduzida aos peixes quando comparado ao afluente da mesma estação.

2.4.1.4. *Aliivibrio fischeri*

A *Aliivibrio fischeri* (Figura 14) é uma bactéria marinha luminescente, anaeróbia facultativa, que atua como decompositor. Em condições ambientais propícias, com concentrações de oxigênio acima de 0,5 mg/L emitem luz naturalmente, caso contrário a bioluminescência da bactéria diminui proporcionalmente a toxicidade da amostra, devido a presença de algumas substâncias que podem inibir os processos metabólicos dessas bactérias (CUNHA, 2011). Dessa forma, no ensaio, é comparada a luminescência perdida pela bactéria em diferentes concentrações da amostra em relação à amostra controle.

Figura 14: Ilustração do organismo *Aliivibrio fischeri*.



Fonte: <http://labs.medmicro.wisc.edu>

Cunha et al. (2012) analisou a toxicidade aguda utilizando a bactéria *Aliivibrio fischeri* em lixiviado bruto e, tratado após tratamentos físico-químicos como coagulação/floculação/precipitação com aplicação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguido por air stripping (técnica de pré-tratamento físico-químico onde ocorre a remoção do nitrogênio amoniacal pela transferência do mesmo, da fase líquida para a fase gasosa, através do contato direto com o ar) e troca iônica. Para o efluente bruto, foram determinadas CE50 entre 13,6 e 28,3%, e as amostras após sequência de tratamento, até o air stripping, apresentaram CE50 de 14,6% e 9,9%, provavelmente devido ao aumento de pH em função da utilização de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no processo. Somente após a troca iônica, a toxicidade presente passou a não ser significativa, demonstrando a importância de determinadas técnicas na redução da mesma.

Silva (2002) empregou a ecotoxicidade aguda como indicador do desempenho das técnicas de tratamento. No efluente bruto, valores máximos de CE50 como 15,02% e 2,26% foram obtidos, em ensaios realizados com a *Aliivibrio fischeri* e *Daphnia simillis*, respectivamente. No entanto, no mesmo efluente pré-tratado, após coagulação/floculação houve diminuição da toxicidade apenas para a *Daphnia*, e ao contrário do esperado, elevou demasiadamente a toxicidade para a bactéria luminescente. Utilizando efluente ozonizado, em maiores dosagens de ozônio, a toxicidade demonstrou tendência de caimento para a *Daphnia*, e a amostra apresentou maior toxicidade frente às bactérias novamente, e com o aumento da concentração de ozônio o efluente apresentou-se também mais tóxico para as mesmas. Em contra partida, o permeado obtido pelo fracionamento com membranas apresentou menor efeito tóxico nos testes com a bactéria, enquanto os valores de CE50 diminuíram em relação

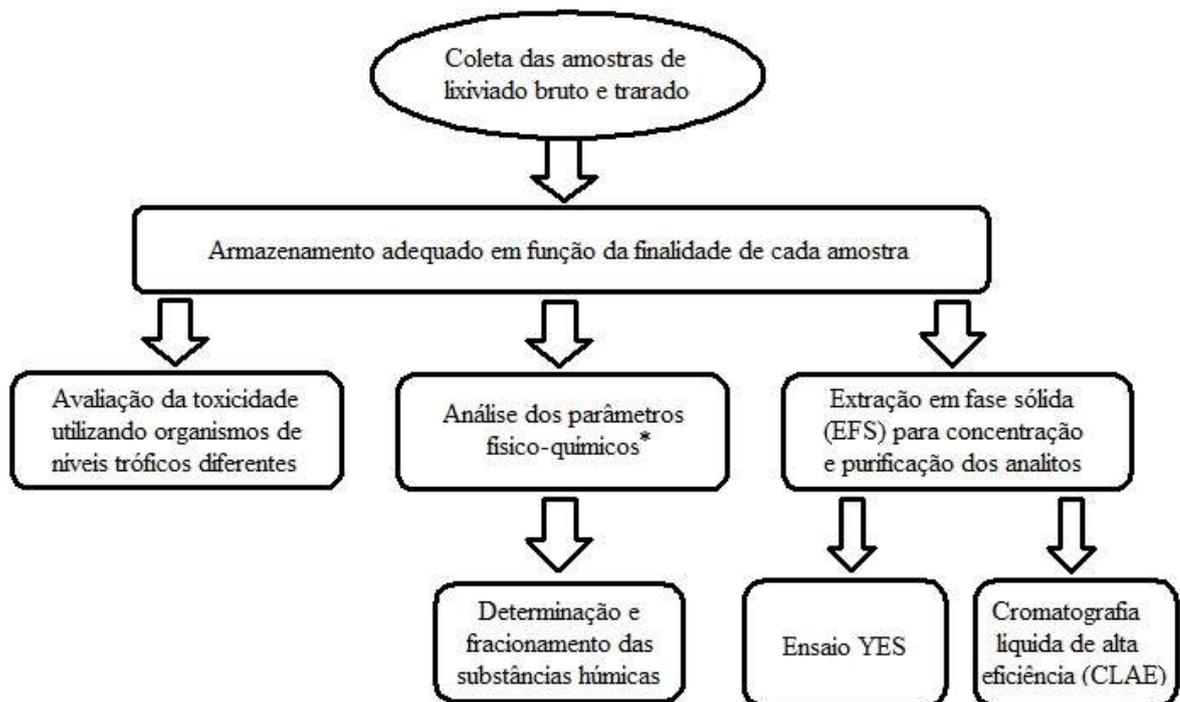
ao efluente pré-tratado utilizando a *Daphnia*, demonstrando como efeitos antagônicos podem ser observados. Efluente pré-tratado e permeado submetidos ao arraste com ar para remoção de amônia também foram analisados quanto à toxicidade, o primeiro se mostrou bastante eficiente, enquanto que o segundo praticamente não reduziu os níveis de toxicidade em relação aos organismos expostos sem a técnica de arraste com ar.

3. METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Engenharia Sanitária e Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ). Apenas a análise de determinação das substâncias húmicas foi realizada no laboratório de Tratamento de Águas e Reúso de Efluentes – Labtare (EQ/UFRJ).

A metodologia utilizada compreende a matriz estudada, a coleta e preservação da amostra, a análise dos parâmetros físico-químicos, ensaios toxicológicos com diferentes organismos-teste e o método de extração em fase sólida (EFS) As etapas gerais realizadas para o alcance dos objetivos propostos neste estudo podem ser visualizados no fluxograma da Figura 15.

Figura 15: Fluxograma das etapas realizadas para o tratamento das amostras.



3.1. Matriz estudada

Foram coletadas oito amostras de lixiviados, no período de maio de 2015 a fevereiro de 2016, em dois aterros sanitários e um lixão encerrado localizados na baixada fluminense.

Para a identificação das amostras, foram utilizados os códigos conforme apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Código das amostras de lixiviado com localização e data de coleta.

Lixiviado	Local de coleta	Data da coleta
A1 bruto	Aterro Sanitário de Seropédica	28/05/2015
A2 bruto	Aterro Sanitário de Seropédica	10/06/2015
A3 bruto	Aterro Sanitário de Seropédica	05/11/2015
B1 bruto e B1 tratado	Aterro Sanitário de Nova Iguaçu	13/11/2015
B2 bruto e B2 tratado	Aterro Sanitário de Nova Iguaçu	19/02/2016
C bruto	Lixão encerrado da Marambaia	08/09/2015

As amostras de lixiviado bruto provenientes do aterro sanitário de Seropédica foram coletadas no Centro de Tratamento de Resíduos (CTR) de Seropédica, em uma lagoa biológica de lixiviado. O CTR Seropédica atende aos municípios do Rio de Janeiro, Seropédica, Itaguaí e Angra dos Reis, além de geradores privados. O aterro tem capacidade para 10.000 toneladas de resíduos diários. O aterro possui pouco mais de cinco anos de operação (HAZTEC.COM.BR).

O Lixão de Marambaia foi desativada no ano de 2003, dando lugar a Central de Tratamento de Resíduos Sólidos (CTR) Nova Iguaçu. Apenas uma amostra deste lixão foi coletada, em uma pequena lagoa de acúmulo, devido ao seu encerramento (aterramento) logo após a primeira coleta (WWW.NOTICIASDENOVAIGUACU.COM).

Amostras brutas do CTR de Nova Iguaçu também foram coletados em uma lagoa biológica de chorume. O aterro trata os resíduos de Nova Iguaçu, Mesquita, Nilópolis, Queimados, São João de Meriti, além de grandes geradores e possui capacidade para 5.000 toneladas de resíduos diários. O aterro de Nova Iguaçu possui 13 anos de operação (HAZTEC.COM.BR e WWW.NOTICIASDENOVAIGUACU.COM).

As amostras de lixiviado tratado, provenientes do aterro de Nova Iguaçu, passaram por uma lagoa anaeróbia (lagoa de acumulação), caixa de areia, lagoa aerada com injeção de oxigênio, tratamento físico-químico tradicional, seguido por membrana de ultrafiltração, e

nanofiltração para polimento. Desse último processo, foram coletadas as amostras tratadas analisadas nesse estudo.

O CTR Seropédica e Nova Iguaçu são compostos por um aterro sanitário bioenergético, com unidade de biogás, de resíduos de serviços de saúde (RSS) e de beneficiamento de resíduos da construção civil (RCC), ETE, laboratório, centro de educação ambiental e viveiro de mudas (HAZTEC.COM.BR).

3.2. Coleta e armazenamento das amostras

Para os parâmetros físico-químicos e as análises ecotoxicológicas, as amostras foram coletadas em bombonas de plástico, estocadas na geladeira e no freezer, respectivamente, sendo necessária a realização das análises até 12h, após descongelamento. Para a determinação de atividade estrogênica e ensaios cromatográficos foram utilizados frascos de vidro âmbar contendo metanol para preservação da amostra, com o intuito de impedir a biodegradação dos analitos de interesse, e, depois foram estocadas na geladeira até 48 h para a EFS. Antecipadamente, os frascos com as amostras foram removidas da geladeira para que atingissem a temperatura ambiente antes dos ensaios serem realizados.

3.3. Caracterização físico-química

3.3.1. Parâmetros físico-químicos

Para as amostras de lixiviado, foram determinados os parâmetros físico-químicos: pH, turbidez, cor (real e aparente), OD, condutividade, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito, fósforo total, alcalinidade total, cloreto, COD, sólidos (SDT, SST, SVT) de acordo com os métodos descritos em AWWA (APHA, 2012), conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos e suas respectivas metodologias descritas em APHA (2012).

Parâmetros	Métodos
pH	4500 - H ⁺ B
Turbidez (NTU)	2130 B
Cor Real e Aparente (Units Pt/Co)	2120 C
OD (mg/L)	4500-O G
Condutividade (S/cm)	2510 B
DQO (mg O ₂ /L)	5220 D
Nitrogênio Amoniacal (mg N-NH ₃ /L)	4500-NH ₃ D
Nitrato (mg N-NO ₃ /L)	4500-NO ₃ ⁻ B
Nitrito (mg N-NO ₂ /L)	4500-NO ₂ ⁻ B
Fósforo Total (mg P /L)	4500 – P E
Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ /L)	2320 B
Cloreto (mg Cl/L)	4500-Cl ⁻ B
COD (mg C/L)	5310 B
Sólidos dissolvidos e suspensos totais (mg/L)	2540 C
Abs ₂₅₄	5910 B

3.3.2. Determinação e fracionamento das substâncias húmicas

O método de Lowry Modificado se baseia em uma mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin Ciocalteau) que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador Cu⁺² e produz um composto em absorção máxima de 750 nm (PETTERSON, 1977, modificado de LOWRY et. al, 1951). Na realização do método foram necessários o preparo de seis soluções:

- Solução A: Solubilização de um mistura de 20 g de carbonato de sódio e 4 g de hidróxido de sódio em béquer de 100 mL com água destilada ou deionizada. Transferência da solução para um balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume e homogeneizar.

- Solução B: Solubilização de 2 g de sulfato de cobre pentahidratado em béquer de 100 mL com água destilada ou deionizada. Transferência da solução para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume e homogeneizar.
- Solução C: Solubilização de 2 g de tartarato de sódio e potássio em béquer de 100 mL com água destilada ou deionizada. Transferência da solução para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume e homogeneizar.
- Solução D (com cobre): Mistura de 1 mL da solução B com 1 mL da solução C diretamente em um balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de pipeta automática, completar o volume com a solução A e homogeneizar.
- Solução D (sem cobre): Transferência de 1 mL da solução C diretamente em um balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de pipeta automática, completar o volume com a solução A e homogeneizar.
- Solução Folin 1N: Diluir o reagente Folin-ciocalteau na proporção 1:2 com água deionizada.

Para se determinar o teor de SH foi diluída, em 10 vezes, 0,5 mL da amostra de lixiviado em água deionizada. Em seguida, foi adicionado 5 mL de solução “D com cobre” em cada tubo de ensaio para os ensaios com cobre; e 5 mL de solução “D sem cobre” para os ensaios sem cobre, e os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, acrescentou-se 0,5 mL da solução de Folin 1:2 e, passados 30 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro nos comprimentos de onda 550 nm, para $[SH] > 25 \text{ mg.L}^{-1}$, e 750 nm para $[SH] = 5 \text{ a } 25 \text{ mg.L}^{-1}$.

A concentração de SH em função da absorbância foi determinada com base na reta de linearização da curva padrão para SH, empregando padrões de 0, 17, 52 e 101 mg.L^{-1} , preparados com ácido húmico comercial (marca Sigma-Aldrich). Em seguida, foi calculada a absorbância dissociada ou corrigida de SH para cada amostra com cobre e sem cobre, pelo uso da Equação 1.

$$ASH = \frac{\frac{As}{Cu} - (F \times \frac{AC}{Cu})}{(1-F)}$$

Equação 1

Onde:

ASH= Absorbância para SH;

F = Fator de redução de absorbância na ausência de CuSO_4 ($F=0,12$, nesse estudo);

As/Cu = absorbância sem a adição CuSO_4 ;

Ac/Cu = absorbância com a adição CuSO_4 .

Algumas das amostras brutas analisadas na determinação de SH foram ainda fracionadas segundo metodologia proposta por Christensen et al. (1998) pelo uso de resinas XAD-8 (Sigma-Aldrich), que possuem maior facilidade de eluição e maior capacidade adsorvente.

O método consiste em fracionar a matéria orgânica presente no lixiviado, em forma de substâncias húmicas, em frações de Ácidos húmicos, de ácidos fúlvicos, e frações hidrofílicas.

Para a extração das SH a resina macroporosa XAD-8, é previamente purificada por bateladas sucessivas, de 24 horas, com soluções de NaOH, metanol, éter dietílico, acetonitrilo e metanol, em béquer de 500 mL. Então, no 5º dia, a resina fica armazenada em metanol até o uso da mesma (Figura 16).

Figura 16: Foto da resina XAD-8 armazenada em metanol.



Inicialmente, as amostras foram acidificadas até pH1. Dessa forma, os ácidos húmicos presentes na amostra foram precipitados e separados por centrifugação (5 rpm durante 5 minutos). Em seguida, a amostra foi filtrada em filtro de acetato de celulose de $0,45\mu\text{m}$, e, o que ficou retido no filtro (parte sólida) é denominada de fração de ácidos húmicos (AH), que posteriormente foi solubilizada com NaOH 0,05 mol/L.

A parte não retida no filtro foi percolada pela resina XAD-8, utilizada para reter os ácidos fúlvicos por adsorção. A parte isolada e concentrada na resina é denominada fração de ácidos fúlvicos (AF), solubilizada posteriormente em NaOH $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. E, a matéria orgânica dissolvida residual não absorvido na resina XAD-8 foi considerada como a fração hidrofílica (HYI) (Figura 17).

Figura 17: Foto do aparato com resina XAD-8 utilizado na separação das frações AF e HYI.



Após finalizado o fracionamento, as concentrações das frações AH e AF foram determinadas utilizando o método de quantificação de Lowry Modificado, como descrito anteriormente.

3. 4. Ensaios de toxicidade aguda

Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com quatro organismos-teste de diferentes níveis tróficos: *Lactuca sativa* (semente de alface – atua como produtor), *Daphnia similis* (microcrustáceo de água doce – atua como consumidor primário), *Danio rerio* (peixe – atua como consumidor secundário) e *Aliivibrio fischeri* (bactéria marinha – atua como decompositor) de acordo com os métodos descritos em Keddy et al. (1995), NBR 12713 (ABNT, 2009), NBR 15088 (ABNT, 2006) e NBR 15411-3 (ABNT, 2006), respectivamente.

3.4.1. Organismo-teste: *Lactuca sativa*

Os ensaios de toxicidade utilizando sementes de alface (Isla, PAK) foram realizados de acordo com Keddy et al. (1995) com algumas modificações. A carta controle foi realizada utilizando água destilada como controle positivo e NaCl como controle negativo. Sabendo que, 80% das sementes deveriam germinar no controle, e no negativo, o crescimento da raiz deveria diminuir conforme o aumento da concentração do cloreto de sódio.

Vinte ensaios de sensibilidade foram feitos usando NaCl como substância de referência, em seis concentrações: 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20 e 0,25 mol/L, além do controle positivo usando apenas água destilada. Todas as concentrações e o controle positivo foram realizados em triplicata.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri de 9,0 cm, e, ao fundo de cada placa foi colocado papel de filtro embebido com 4 mL de solução de NaCl e 20 sementes de alface distribuídas uniformemente pela placa. Ao longo dos ensaios, dois lotes distintos de semente de alface foram utilizados (lote 1: 32135-S2 e lote 2: 38486-S2) na realização dos testes da carta controle.

A germinação ocorreu em estufa (Quimis®) à temperatura de 22 ± 2 °C, por 5 dias (120h) de exposição, na ausência de luz, para avaliação do crescimento radicular.

Após a construção da carta controle, estipulou-se concentrações da amostra (lixiviado bruto e tratado) com fator de diluição de 0,5: 0 (controle); 0,75; 1,5; 3; 6; 12; 25; 50 e 100% para a determinação de toxicidade aguda, que foi encontrada com o auxílio da curva dose-resposta através do cálculo da CE (L)50. E, assim como na carta controle, no ensaio foram

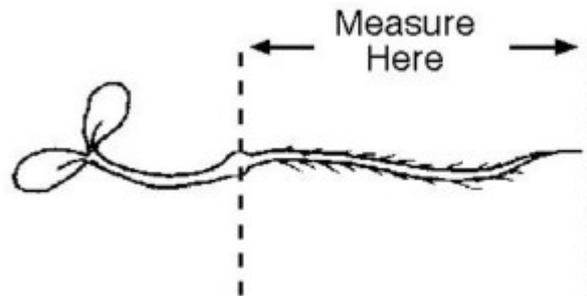
usadas placas de Petri, com o fundo da placa coberto com papel de filtro (Unifil®) embebidos com 4 mL de amostra diluída em água destilada de acordo com a concentração definida, onde foram dispostas as vinte sementes de alface e colocadas na estufa sob as mesmas condições anteriores. As placas foram colocadas na estufa, com fitas ao redor para vedação (Figura 18), evitando contaminação de placas com concentrações distintas e evitando a evaporação da solução. Portanto, para cada amostra foram necessárias 27 placas, contabilizando as triplicatas de cada concentração e do controle.

Figura 18: Foto das placas de Petri armazenadas no interior da estufa no ensaio com a *Lactuca sativa*.



Ao término do ensaio, no 5º dia, foi realizada a contagem das sementes que germinaram e foram feitas as medições dos comprimentos das raízes (radícula) em mm, com o auxílio do paquímetro digital (DIGIMED®), conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 19: Demonstração da medição da raiz após germinação da semente de alface.



Fonte: CUNHA, 2011.

Na Figura 20, observa-se o crescimento radicular das plântulas após tempo de encubação. A análise permite determinar o efeito do alongamento da raiz em presença de substâncias tóxicas através da CE50 calculada com o auxílio do software ORIGIN 8.0.

Figura 20: Foto da germinação das sementes de alface em uma placa de Petri ao final do ensaio.



3.4.2. Organismo-teste: *Daphnia simillis*

Os ensaios utilizando os organismos *Daphnia simillis* foram realizados segundo a norma NBR 12713 (ABNT, 2009). No ensaio, são utilizados indivíduos jovens (6-24 horas de idade) obtidos a partir de fêmeas de 7-28 dias e alimentados com algas (*Monoraphidium dybowskii*) ou ração para peixe, apenas durante o cultivo.

Para o teste de sensibilidade foram preparadas 6 amostras nas concentrações 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5 e 25% diluídas em água de cultivo. Foram colocados 10 mL de cada solução em tubos de ensaio e 5 indivíduos em cada um deles. Os ensaios foram conduzidos em quadruplicadas, somando 20 indivíduos por diluição.

O ensaio foi realizado em incubadora (Ethik Technology[®]) com controle de temperatura (20 ± 2 °C), utilizando sistema de fotoperíodo com duração de 48 horas (16 horas de luz e 8 horas de escuro). O procedimento permite determinar a CE50 através do software TRIMMED SPEARMAN-LCPIN.

3.4.3. Organismo-teste: *Danio rerio*

O ensaio utilizando os organismos *Danio rerio* foram realizados segundo a norma NBR 15088 (ABNT, 2006). São necessários alguns cuidados com a água de cultivo a ser utilizada ao longo do teste como pH, teor de oxigênio dissolvido, temperatura e dureza e com a manutenção do aquário onde são depositados os peixes, como renovação da água e remoção de detritos no fundo do aquário.

Foram expostos 10 organismos em 1 litro de cada amostra em diferentes concentrações, sendo mantidos em contato por 48 horas. As amostras de lixiviado bruto, provenientes dos aterros sanitários e lixão, foram analisadas em concentrações de 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25% e as amostras de lixiviado tratado foram analisadas em concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25% utilizando água de cultivo como controle. Após ensaio, os organismos mortos foram contabilizados e através do software GWBASIC foram determinados os resultados expressos em CL₅₀.

3.4.4. Organismo-teste: *Aliivibrio fischeri*

O ensaio utilizando os organismos *Aliivibrio fischeri* foram realizados segundo a norma NBR 15411-3 (ABNT, 2006). No ensaio foram feitas diluições das amostras com o diluente (NaCl) em cubetas, onde foram adicionadas 0,9 mL da amostra diluída (2,8; 5,6; 11,25; 22,5 e 45%) + 0,1 mL da solução de bactéria diluída. E, no controle negativo, foi utilizado Zn como substância de referência. E, em 30 minutos as leituras foram determinadas, através do software Microtox OMNI 4.1, gerando resultados e respostas expressas como CE50, avaliando a redução da bioluminescência da bactéria em cada amostra.

3.5. **Análise dos DEs: ensaio YES e CLAE**

3.5.1. Limpeza das vidrarias

Inicialmente, todos os frascos utilizados nas coletas das amostras e as vidrarias que seriam utilizadas ao longo de todo processo da extração foram devidamente limpos com solução a 5% de um concentrado de tensoativos (Extran®, Merck), que quando diluído possui grande poder de detergência, removendo completamente as impurezas das vidrarias usadas. Os frascos e vidrarias ficaram submersos na solução de extran por 24 horas, em seguida foram enxaguados 10 vezes com água de torneira para remoção do extran. Logo após, a vidraria foi rinsada uma vez com acetona (grau HPLC, Tedia), cinco vezes com água ultra pura obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®), uma vez com etanol (grau HPLC, Tedia) e três vezes com água ultra pura, necessariamente nessa ordem. E após todo o processo de lavagem, eram colocados na estufa à 60°C por um período de 4 horas, com exceção para os materiais volumétricos como proveta, pipeta graduada e volumétrica, que eram secos naturalmente. Foi usado uma vidraria exclusiva para o ensaio YES e análise cromatográfica evitando interferentes.

3.5.2. Extração em Fase Sólida (EFS)

Para a determinação de atividade estrogênica pelo ensaio *in vitro* YES ou identificação dos estrpogênios e o bisfenol A por CLAE, as amostras de lixiviado bruto e tratado foram filtradas anteriormente a EFS (Figura 21), em temperatura ambiente, em filtros de papel,

seguido de filtro de membranas de fibra de vidro com poro de 1,2 μm de diâmetro (Merck) e posteriormente em membranas de acetato de celulose com poro de 0,45 μm de diâmetro (Merck) (Figura 22). Dessa forma, a filtração auxilia na etapa de percolação da amostra pelo cartucho, à medida que impurezas com diâmetro até 0,45 μm ficam retidas nas membranas usadas no processo.

Figura 21: Foto do aparato de filtração usado nas amostras de lixiviados de RSU.



Figura 22: Foto do papel de filtro e membranas utilizadas no processo de filtração das amostras de lixiviados de RSU.



Devido a dificuldade da passagem da amostra pelo cartucho, por ser uma matriz complexa, foi necessária a utilização de dois tipos de cartuchos na extração de cada amostra. Foram empregados cartuchos de limpeza acoplados a cartuchos de diferentes colunas, no intuito de otimizar o tempo de extração e obter melhores resultados através da remoção de interferentes, antes de definir o cartucho a ser utilizado.

Comparou-se três tipos de cartuchos: Strata X (Phenomenex®), Agilent (Agilent Technologies®) e Oasis HLB (Waters OASIS®) e destes, foi escolhido a utilização dos cartuchos de limpeza Strata SAX (Phenomenex®,) acoplados a cartuchos Oasis HLB. Na Tabela 6, pode ser observado algumas das características dos cartuchos usados na metodologia de extração do presente estudo.

Tabela 6: Características dos cartuchos usados na metodologia proposta.

Cartucho	Sorvente	Massa de sorvente e volume do cartucho
OASIS HLB	Polimérico com cadeia lipofílica	500mg/6 mL
STRATA SAX	Base sílica	500 mg/6 mL
AGILENT	C18	1g /6ml
STRATA X	Polimérico com cadeia lipofílica	500mg/ 6mL

A EFS foi realizada em Manifold, da Agilent Technologies®, sob vácuo a uma vazão de 3 mL/min, em capela. Foram utilizados quatro cartuchos na etapa de extração para cada amostra coletada, dois cartuchos acoplados para o ensaio YES e outros dois para a CLAE. As etapas realizadas para a EFS são descritas a seguir:

1) Condicionamento dos cartuchos: Para o condicionamento do cartucho OASIS HLB, foi empregado: 6 mL de hexano; 2 mL de acetona; 6 mL de metanol e 10 mL de água ultra pura com pH 3 (ajustado com ácido clorídrico). E, no caso do STRATA SAX (cartucho de limpeza) foi empregado: 10 ml de metanol e 10 ml de água ultra pura sem ajuste do pH. Nos dois condicionamentos, uma película de líquido acima da fase sólida do cartucho foi mantida evitando ressecamento dos poros e consecutivamente a perda do analito.

- 2) Passagem da amostra pelos cartuchos: O cartucho de limpeza foi colocado antes do cartucho OASIS HLB para a passagem de 100 mL da amostra com pH 2 (ajustado com ácido clorídrico) de forma sequencial (Figura 23). No entanto, após acidificar a amostra com HCl concentrado (Vetec), houve sedimentação de material presente em algumas amostras (Figura 24), tendo a necessidade de filtrar todas as amostras novamente, apenas com membrana de fibra de vidro de 1,2 μm (Merck), com o intuito de padronizar os procedimentos realizados. Ao final, o cartucho de limpeza foi removido e descartado.
- 3) Clean up: Conhecida como a etapa de limpeza do cartucho, nessa etapa, 10 mL de solução de metanol e água ultra pura na proporção de 1: 9, ou seja, 1 mL de metanol e 9 mL de água ultra pura em cada cartucho.
- 4) Eluição: Nessa etapa, 4 mL de acetona passam pelo cartucho, pela ação da gravidade, removendo as substâncias importantes que ficaram retidas no cartucho e, este foi totalmente seco com o auxílio da bomba à vácuo durante 5 min e depois descartado. O volume eluído em frasco de vidro foi seco até que toda a acetona fosse evaporada.
- 5) Ressuspensão: A amostra retida nos frascos de vidro são ressuspensas em 2 mL de etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®) para determinação de atividade estrogênica pelo ensaio YES e ressuspensas em 2 mL de acetonitrila para os ensaios na cromatografia líquida (CLAE).

Figura 23: Foto dos cartuchos STRATA SAX acoplado ao cartucho OASIS HLB na etapa de passagem da amostra pelos cartuchos durante a EFS.



Figura 24: Foto das membranas utilizadas na filtração de amostras brutas após acidificação com ácido clorídrico.



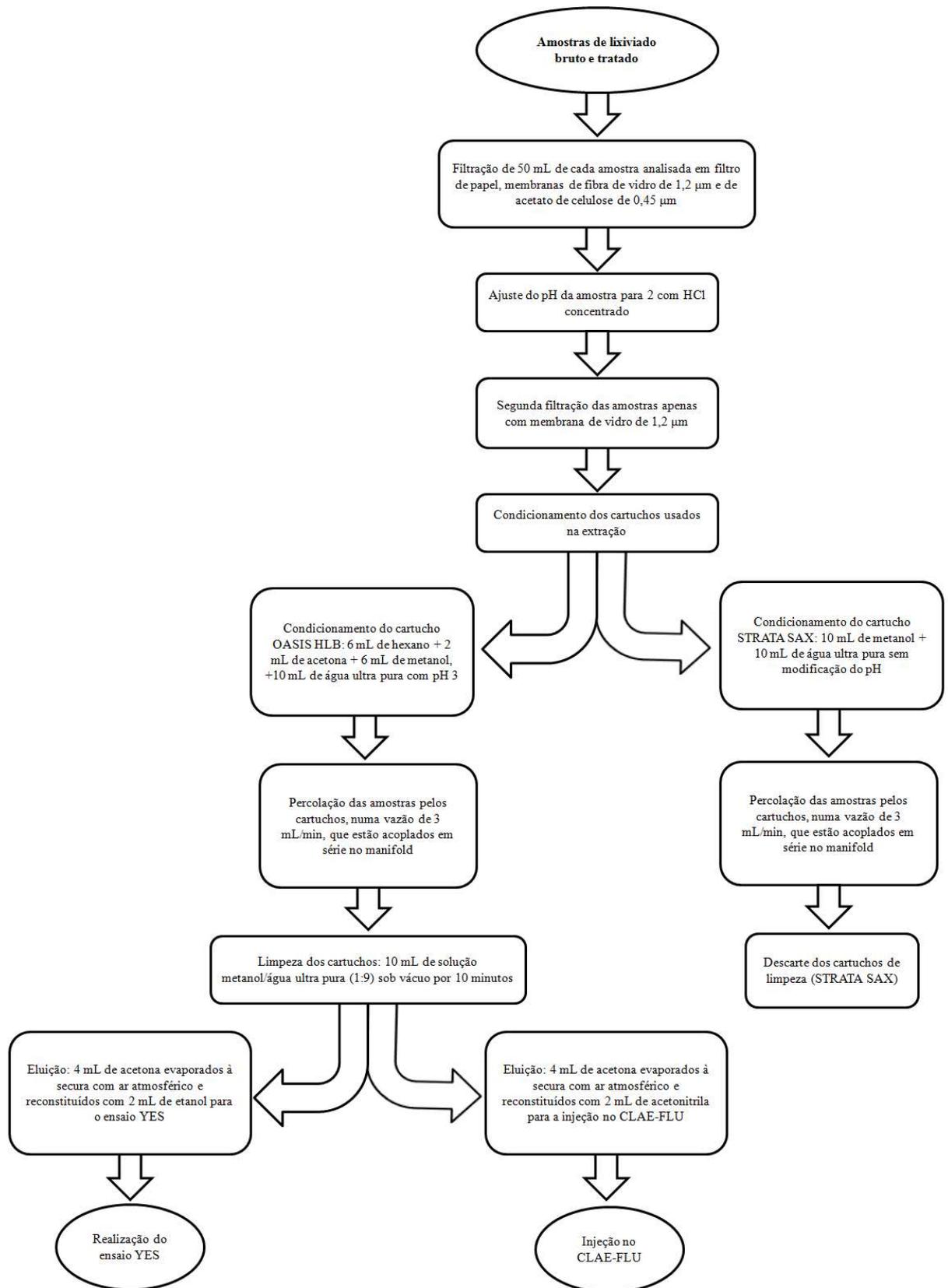
Dessa forma, pelo método de extração, as amostras foram concentradas 25 vezes em relação a amostra inicial. Após a ressuspensão, as amostras retidas nos frascos foram colocadas em um agitador (IKA[®], MS 3 digital), para homogeneização das mesmas, e depois armazenadas na geladeira até que fossem realizadas as análises do ensaio YES e cromatografia. O fluxograma de todo o procedimento de extração pode ser visto na Figura 25.

Além da identificação dos lixiviados, algumas das amostras analisadas, foram também identificadas em relação ao volume de extração usado nos testes iniciais de EFS, com o intuito de determinar o menor volume possível de extração para a determinação de atividade estrogênica e, identificação e quantificação dos DEs através da CLAE. Somente as amostras A1, A2 e C brutas foram extraídas com volumes diferentes, pois foram as primeiras amostras a serem coletadas. Para melhor entendimento, pode ser visto na Tabela 7 o volume de extração para cada amostra, sendo os índices 1 = 10 mL, 2 = 50 mL e 3 = 100 mL.

Tabela 7: Identificação das amostras usadas com diferentes volumes na EFS.

Código da amostra	Volume de extração (mL)
A1.1 bruta	10
A1.2 bruta	50
A2.1 bruta	10
A2.2 bruta	50
C1 bruta	10
C2 bruta	50
C3 bruta	100

Figura 25: Fluxograma detalhado das etapas de preparo das amostras até o extrato final para a realização do ensaio YES e para análise na CLAE.



3.5.3. Ensaio *in vitro* YES

O procedimento foi desenvolvido de acordo com a metodologia de Routledge e Sumpter (1996) com algumas modificações de acordo com Bila (2005).

Inicialmente foi realizado o cultivo da cepa *Saccharomyces cerevisiae* e todo seu preparo foi realizado em capela de fluxo laminar (Filterflux®). A cepa que pode ser obtida pelo grupo Glaxo, foi cedida pelo Laboratório de Controle da Poluição das águas do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. Próximo à realização do ensaio a cepa é descongelada, e são realizados o pré-inóculo e inóculo onde os frascos de cultivo são incubados em condições adequadas ao longo dos dois procedimentos.

3.5.3.1. Reagentes

Reagentes com alto grau de pureza foram usados durante o ensaio YES, devido a possíveis contaminações de reagentes inferiores, ocasionando resultados não reais. Os reagentes utilizados foram: adenina, ácido aspártico, inositol, L-arginina-HCl, L-fenilalanina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina-HCl, L-metionina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-ácido glutâmico, L-valina, tiamina, pantetonato de cálcio, piridoxina, D-glucose, sulfato de cobre (II) e KOH peletes, biotina e o CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) foram obtidos da Sigma-Aldrich e etanol, hexano, metanol e acetona são grau HPLC da Tedia Brasil.

3.5.3.2. Preparo das soluções

O protocolo desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996) para determinação da atividade estrogênica, foi adaptado segundo Bila (2005) com modificações no cultivo da cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

O preparo das soluções (Meio Mínimo, Glicose, Ácido L-aspártico, L-treonina, Sulfato de Cobre, Vitamina, CPRG e Meio de Cultivo) encontra-se disponível no ANEXO 1 e todos os reagentes utilizados no preparo eram manuseados em capela de fluxo laminar.

3.5.3.3. Congelamento, descongelamento, pré-inóculo e inóculo

Anteriormente ao pré-inóculo e inóculo, a cepa foi descongelada 48 horas antes do ensaio, uma vez que, as células restantes do inóculo em ensaios anteriores, são congeladas em tubo criogênico estéril contendo solução de 1,5 mL de células em meio de cultivo e glicerol estéril (esterelizado a 121°C durante 15 min) na proporção de 60 e 40% respectivamente. Os tubos são armazenados a temperatura de -20 °C e podem ser armazenados por um período de um ano, ou por mais tempo, em temperaturas ainda mais baixas.

Após o descongelamento da cepa foi preparado o pré-inóculo, onde as células presentes no tubo são ressuspendidas em 10 mL de meio de cultivo em frasco de cultivo novo e estéril, incubados durante 24 horas sob agitação de 150 rpm e 28 °C, em incubadora com agitação orbital da marca Quimis (modelo Q816M20). Posteriormente, foi realizado o inóculo adicionando-se 100 µL da cultura do pré-inóculo em outro frasco de cultivo estéril contendo 10 mL de meio de cultivo, e levando a incubação sob as mesmas condições do pré-inóculo, e obtendo a cepa necessária para execução do ensaio.

3.5.3.4. Preparo do meio de análise

Previamente ao preparo do meio de análise é necessário o prepararo do meio com a cultura da levedura, realizados em tubos falcon estéreis, pela adição de 4 mL de meio de cultivo e 3 mL do cultivo da levedura (cepa obtida após o inoculo).

Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância da cultura da levedura a 620 nm. A absorbância numa faixa de 0,8 a 1,0 indica que a cultura está boa para uso, portanto um valor inferior ou superior a 0,8 indica que um pequeno volume de levedura ou de meio de cultivo, respectivamente, deve ser acrescentado até atingir a absorbância dentro da faixa requerida.

Todo o procedimento de preparo de meio foi feito na capela de fluxo laminar, e uma vez retirada da capela de fluxo laminar para fazer a leitura da absorbância da cultura da levedura, esta não foi mais utilizada.

Para o preparo do meio de análise, em tudo falcon estéril, foram adicionados 25 mL do meio de cultivo, 250 µL de solução de CPRG e 25 µL do meio com a cultura de levedura,

para um ensaio feito em uma placa de 96 poços, podendo ser analisado apenas duas amostras em duplicata com seus respectivos controles negativos (brancos).

3.5.3.5. Procedimento de análise do ensaio YES

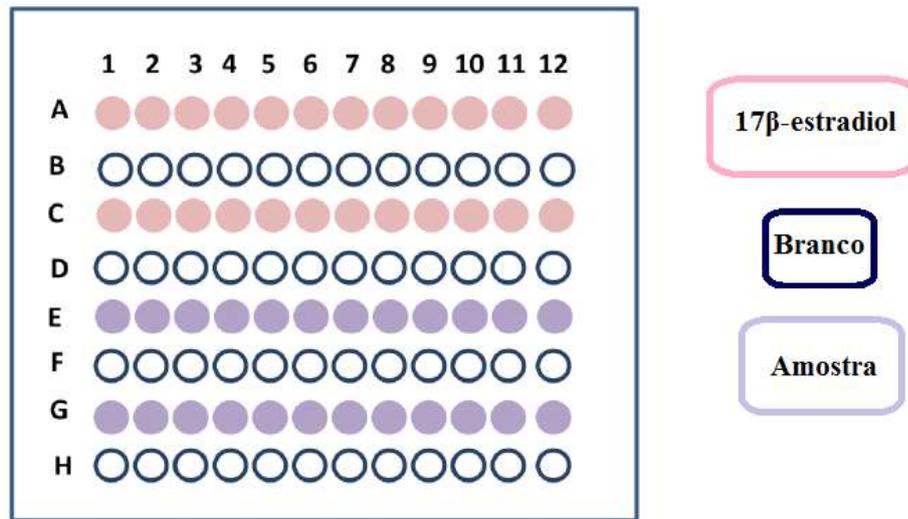
O procedimento de análise do ensaio foi desenvolvido de acordo com a metodologia de Routledge e Sumpter (1996) e Bila (2005), com algumas modificações. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços (Kasvi), contendo 8 fileiras e 12 colunas, e preparadas em capela de fluxo laminar. Todo o material utilizado no manuseio e estocagem das soluções na análise foi exclusivo para o ensaio YES, e devidamente esterilizado. Todo o procedimento foi feito em capela de fluxo laminar.

Para o ensaio é necessário a diluição dos extratos da amostra obtido na etapa anterior através da EFS, garantindo dessa forma, que a concentração da amostra esteja dentro da curva do controle positivo. O preparo dessas diluições seguem as etapas a seguir na proporção 1:2:

- Primeiro são adicionados 100 μL de etanol (grau HPLC) nos poços da primeira fileira com exceção do primeiro poço, onde são adicionados 200 μL de extrato.
- Após completar a primeira fileira da placa, inicia-se a diluição a partir do segundo poço pela adição de 100 μL do primeiro poço, e, homogeneizo a solução no poço com o auxílio da própria pipeta.
- No terceiro poço adiciono 100 μL do segundo poço e assim sucessivamente até o último poço da primeira fileira que terminará com volume final de 200 μL .

Após a diluição, 10 μL de cada poço foram transferidos para a placa de análise, distribuída da seguinte forma: uma fileira para a amostra e outra para o branco, em duplicata, sempre de forma intercalada (Figura 26), evitando contaminação cruzada.

Figura 26: Demonstração da disposição do controle positivo (17β -estradiol), da amostra e do branco na placa de 96 poços.



Fonte: Silva (2015).

Da mesma forma, diluições da curva padrão do controle positivo 17β -estradiol eram executadas a cada ensaio YES, e uma nova curva era realizada. Para esta diluição, foi preparada uma solução estoque com concentração de $54,48 \mu\text{g.L}^{-1}$ preparada a partir de 17β -estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) em etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®).

Durante o preparo da placa, primeiramente eram adicionadas as fileiras com o branco, objetivando a redução de possíveis contaminações. As fileiras B, D, F e H são os brancos (controle negativo), como observado na Figura 8, constituído por etanol e meio de análise.

Para o preparo da placa de ensaio foram executados os seguintes passos:

- Primeiramente, em cada poço, referente à fileira do branco, foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de etanol. E, para as fileiras de amostra, foram transferidos $10 \mu\text{L}$ dos extratos diluídos na placa de diluição para a placa de ensaio.
- Deixou-se a placa aberta para completa evaporação da amostra dentro da capela de fluxo laminar, durante alguns minutos, restando apenas a massa das amostras. E, só então foi dado prosseguimento do ensaio.
- Passado o tempo necessário de evaporação, $200 \mu\text{L}$ do meio de análise foram adicionados em cada poço, nas fileiras de branco e amostras, porém estas adições foram feitas primeiro nas fileiras com o branco e em seguida com as

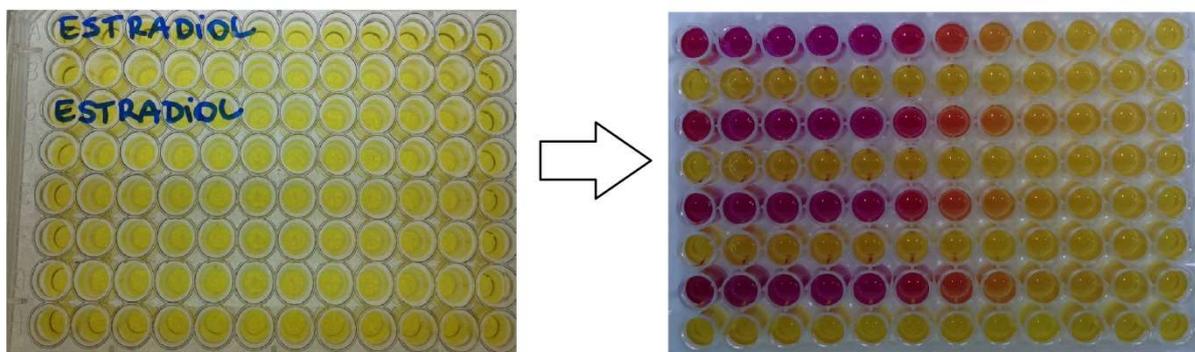
amostras, evitando contaminação do meio de análise através da ponteira acoplada na pipeta utilizada. E, é importante ressaltar que, nos poços em que são adicionados o controle positivo, os 200 μL do meio de análise também são acrescentados, gerando outra diluição do controle, atingindo concentrações de 2724 ng.L^{-1} a 1,3301 ng.L^{-1} .

- Em seguida, as placas foram tampadas e vedadas com fita adesiva ao redor de toda a placa. Logo após foram colocadas em um agitador de placas (IKA, MS 3 digital) durante 2 minutos e incubadas em estufa aquecida a 30 °C por um período de 72 horas.

As placas são removidas da estufa após período de incubação, sendo possível observar a alteração da coloração dos poços da fileira da amostra (Figura 27). Os poços com coloração amarela mudam para uma coloração em tons de rosa a roxo, caso haja atividade estrogênica na amostra analisada, em função da produção da β -galactosidase. E, há também aumento da turbidez nos poços, em virtude do crescimento da levedura.

Nesse momento, com o auxílio do espectrofotômetro (Softmax Pro 5, SpectraMax M3) com entrada para placas de 96 poços, foi realizada a leitura das mesmas em dois comprimentos de onda: 575 nm e 620 nm, para cor e turbidez, respectivamente.

Figura 27: Placa de ensaio antes e após incubação.



Após a leitura, o descarte das placas usadas no ensaio foi realizado somente depois de serem autoclavadas por 15 minutos a 121 °C, seguindo o protocolo de biossegurança, a fim de inativar o organismo, mesmo sendo de baixo risco.

Com relação a avaliação do limite de detecção, em função da dose resposta do controle positivo 17 β -estradiol, o limite de detecção para cada ensaio pode ser calculado. A atividade estrogênica superior a 10% do valor do branco foi avaliada como positiva.

3.5.3.6. Análise dos dados

Como já mencionado, a leitura das placas foram feitas em dois comprimentos de onda, e por isso, há necessidade da correção da absorbância da amostra, em cada um dos poços. Para o cálculo da correção da absorbância, foi feita a média dos valores das absorbâncias das fileiras de branco de cada uma das amostras (linhas B e D ou F e H). O valor da absorbância corrigida pode ser determinado de acordo com Bila (2005), segundo a Equação 2:

$$Abs_{\text{Corrigida Amostra}} = Abs_{575\text{Amostra}} - (Abs_{620\text{ Amostra}} - Abs_{620\text{ Branco}}) \quad \text{Equação 2}$$

Após a correção da absorbância das amostras, pode-se construir os gráficos com o auxílio do programa Origin® 6.0 para obtenção da curva dose-resposta, relacionando os valores de absorbância corrigida em função da concentração (ng.L-1) em escala logarítmica em relação ao controle positivo 17 β -estradiol ou em percentual em relação aos extratos das amostras.

Portanto, foi determinado o CE50 do 17 β -estradiol que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio YES, em relação à curva padrão. E, para as amostras, além da determinação do CE50 é calculado o equivalente estradiol (EQ-E₂) da máxima indução da β -galactosidase, através da interpolação dos dados da curva da amostra com os da curva do controle positivo 17 β -estradiol, conforme a Equação 3:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad \text{Equação 3}$$

Sendo:

y = valor da Abs corrigida da Amostra;

x = concentração da substância estrogênica no ensaio (EQ-E₂);

A_1 = máxima indução da atividade estrogênica;

A_2 = mínima indução da atividade estrogênica;

x_0 = valor de EC₅₀; e

p = inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta.

As incógnitas A_1 , A_2 , x_0 e p são dados relativos à curva do controle positivo 17 β -estradiol e o resultado da Equação 2 acima, é dividido pelo fator de concentração utilizado na EFS na determinação do valor real de EQ-E₂ presente na amostra.

A toxicidade é algo presente em amostras mais complexas, devido a presença de compostos tóxicos, podendo gerar a inibição do crescimento da levedura, facilmente visualizada pela ausência de turbidez no fundo do poço. Nesse caso, de acordo com Frische et al. (2009), é utilizado o controle da absorvância a 620 nm para quantificar a inibição do crescimento da levedura devido a toxicidade das amostras (Equação 4).

$$Toxicidade = 1 - \left(\frac{Abs_{620}(amostra)}{Abs_{620}(branco)} \right) \quad \text{Equação 4}$$

Sendo: $Abs_{620}(amostra)$ a média da leitura de absorvância a 620 nm de cada diluição da amostra a $Abs_{620}(branco)$ a média da leitura da absorvância a 620 nm para as duas fileiras de branco correspondentes à cada amostra analisada.

De acordo com a Equação 4, quando a toxicidade da amostra for ≤ 0 , admite-se que não há toxicidade quando o resultado dá igual a zero, indicando que o crescimento das células na amostra e no branco foram iguais, ou menor do que zero, indicando que o crescimento de células na amostra foi maior do que no branco. Portanto, há toxicidade quando o resultado é

superior à zero (positivo diferente de zero), o que indica que cresceram menos células na amostra do que no branco.

Caso a amostra não apresente resposta estrogênica positiva, verifica-se a presença de toxicidade, e se presente na amostra, a mesma precisa ser diluída. Após diluição, caso não tenha toxicidade, provavelmente a amostra não é estrogênica ou a concentração de estrogênios está abaixo do limite de detecção do ensaio.

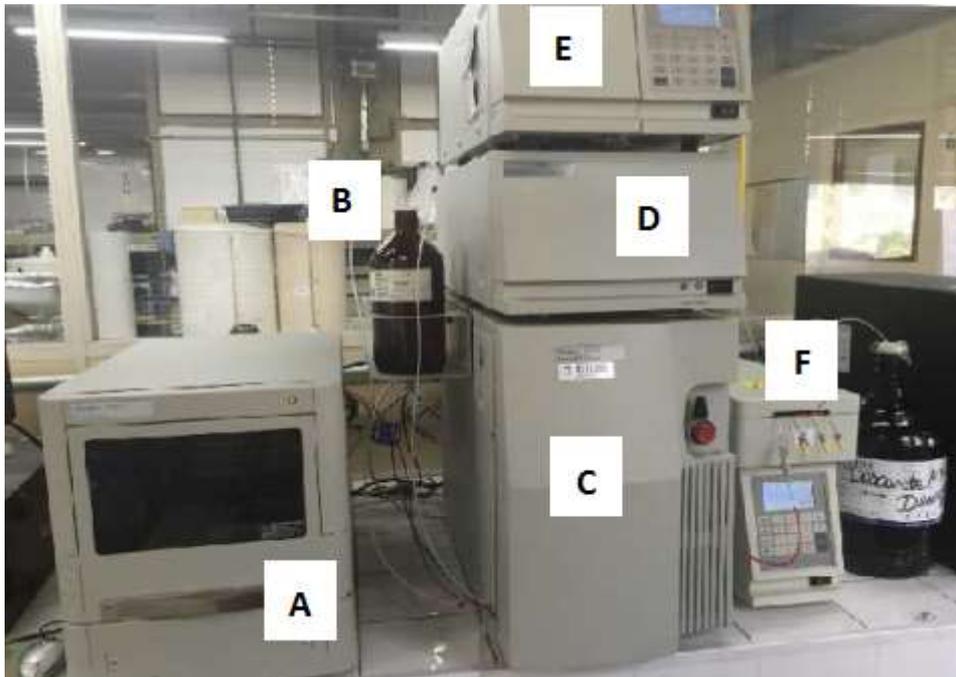
3.5.4. Análises Cromatográfica (CLAE/FLU)

3.5.4.1. Determinação dos estrogênios

Os estrogênios 17β -estradiol (E_2), 17α -etinilestradiol (EE_2) e estriol (E_3) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em um cromatógrafo fabricado pela Waters Corporation®, utilizando detector de fluorescência com comprimentos de onda de emissão à 306 nm e excitação à 280 nm.

A metodologia implementada para detecção e quantificação dos hormônios foi fundamentado no trabalho de Oliveira (2015) com algumas modificações conforme Silva (2016) tendo em vista, melhor eficiência do método. Foi empregada a Novapak PAH (4,6 x 250mm, 5 micras) como coluna cromatográfica, sob a temperatura de 30 °C com auxílio do forno de colunas. O equipamento utilizado na determinação e quantificação dos DE é formado por vários aparelhos identificados como A, B, C, D, E e F, conforme Figura 28.

Figura 28: Equipamento de CLAE.



(A) Amostrador; (B) recipientes para a fase móvel; (C) duas bombas pistão (portanto trabalha-se com até dois solventes), redutor de pulso, misturador de solventes e gaseificador; (D) detector de DAD-UV que gera sinal em uma ampla faixa de comprimento de onda; (E) Detector de Fluorescência e (F) Coluna cromatográfica.

As condições de análise para os estrogênios foram: fluxo de 1 mL/min de fase móvel, modo gradiente variando a percentagem de acetonitrila (ACN) e água ultra pura, iniciando com 40% de ACN, mudando para 50 % em 6 minutos, 30 % em 9 minutos e 40% após 13 minutos até o tempo total de corrida de 15 minutos para a análise dos hormônios, conforme Tabela 8. As fases móveis utilizadas (ACN e água ultra pura) possuem alto grau de pureza e estão livres de oxigênio e outros gases dissolvidos. O volume injetado foi de 20 μ L com três repetições para cada amostra e a temperatura do amostrador foi fixada em 18°C com o objetivo de evitar possíveis degradações das amostras ao longo da análise.

Tabela 8: Variação dos solventes (ACN e água ultra pura) com o tempo em modo gradiente.

Tempo (min)	ACN (%)	Água ultra pura (%)
0	40	60
6	50	50
9	30	70
13	40	60
15	40	60

As curvas de calibração foram preparadas pela injeção de um padrão, contendo aproximadamente 50 µg/L de cada estrogênio e pela modificação do volume de injeção determinou-se cinco concentrações, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Concentrações teóricas de E₂, EE₂ e E₃ para a construção da curva analítica.

Volume de injeção (µL)	E ₂ (µg/L)	EE ₂ (µg/L)	E ₃ (µg/L)
20	53	66,5	50
16	42,4	53,2	40
8	21,2	26,6	20
4	10,6	13,3	10
3	7,95	9,975	7,5

3.5.4.2. Determinação do bisfenol A

Para a determinação do bisfenol A (BPA), foi utilizado o mesmo equipamento de CLAE, mas empregando um método diferente do usado na determinação dos estrogênios. As condições de análise foram fixadas em 55% de acetonitrila e 45% de água ultra pura como fase móvel em um fluxo de 1 mL/min no modo isocrático resultando em um tempo de corrida de 8 minutos. A metodologia foi desenvolvida em detector de fluorescência com comprimentos de onda de emissão à 300 nm e à 223 nm de excitação. O volume de injeção foi de 20 µL em triplicata, mantendo a temperatura da coluna em 40°C e do amostrador em 18°C.

A curva de calibração foi preparada através da injeção de um padrão do bisfenol-A, contendo aproximadamente 18 µg/L e com a variação do volume de injeção obteve-se cinco concentrações diferentes, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Concentrações teóricas de bisfenol A para a construção da curva analítica.

Volume (µL)	BPA (µg/L)
20	18,70
15	14,02
10	9,35
5	4,67
2,5	2,33

3.5.4.3. Análise da seletividade, LD, LQ, linearidade e recuperação

Foi utilizado como parâmetro, para validação do método descrito, o guia sobre validação de métodos analíticos, fornecido pelo INMETRO (2010) que analisa a seletividade, LD, LQ, linearidade e recuperação, tanto para os hormônios como para o BPA. De acordo com o guia, a linearidade foi determinada em função da curva padrão avaliando os valores de R e R², o LQ foi obtido pela menor concentração da curva analítica e o LD foi obtido segundo a Equação 5, sendo DP o desvio padrão referente as três injeções do branco (padrão com a menor condição aceitável do analito).

$$LD = DP \times 6,965$$

Equação 5

A seletividade e a recuperação foram determinadas em função da dopagem de uma das amostras brutas coletadas no aterro sanitário, com concentrações conhecidas dos três hormônios e BPA, como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11: Concentrações e volumes dos padrões de E₂, EE₂, E₃ e BPA usadas na dopagem de uma das amostras brutas de lixiviado coletadas para o teste de recuperação.

Padrões	[] µg/L	Volume (µL)	
		1ª dosagem	2ª dosagem
E ₂	53	1,26	0,63
EE ₂	66,5	1,26	0,63
E ₃	50	1,26	0,63
BPA	24,14	1,11	0,65

Segundo Brasil (2011), o fator de recuperação em um ensaio realizado a partir da dopagem de uma amostra/matriz branca, é realizado conforme a equação 6:

$$Rec = \frac{c_1 - c_2}{c_3} \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Sendo:

C1 = Concentração medida após fortificação da matriz branca;

C2 = concentração medida na matriz branca não fortificada; e

C3 = concentração do analito puro adicionado à matriz branca.

A concentração dos hormônios e BPA nas amostras foi calculada pela equação 7:

$$[Ei] = \frac{R \cdot V_{res}}{V_{ext}} \quad \text{Equação 7}$$

Sendo:

[Ei] = Concentração do composto na amostra;

R = Resposta obtida pela cromatografia;

V_{res} = Volume de ressuspensão em acetonitrila; e

V_{ext} = Volume de extração.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química dos lixiviados bruto e tratado

A Tabela 12 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de lixiviado A, B_{bruto} e B_{tratado}, e C.

As faixas de valores de cloreto e alcalinidade na literatura encontram-se normalmente altas, em torno de 2199 a 4204 mg/L e 3325 a 5015 mg/L, respectivamente, em lixiviados de aterros no Brasil (REIS, 2014).

A baixa concentração de fósforo também está em conformidade ao encontrado na literatura, não sendo superior a poucas dezenas de mg/L, no entanto, pode ser um nutriente limitante para o crescimento das sementes de alface quando em contato com as amostras analisadas nesse estudo (SOUTO, 2009).

O fósforo, cloretos e sólidos suspensos não tem tendência crescente ou decrescente em função da idade do aterro, a sua variação está mais influenciada com as estações do ano (SANTOS, 2011)

Quantidades significativas de matéria orgânica podem estar presentes no lixiviado, e como consequência da idade do aterro, valores mais baixos de DQO são relatados em aterros mais velhos (TCHOBANOGLIOUS et.al 1993) como é o caso dos lixiviados estudados, provenientes de aterros com mais de cinco anos de operação.

Tabela 12: Valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de lixiviado bruto e tratado proveniente de aterro sanitário (A e B) e valores dos parâmetros para a amostra proveniente do lixão (C).

Parâmetros físico-químicos	Amostras								Unidade
	A1 bruta	A2 bruta	A3 bruta	B1 bruta	B1 tratada	B2 bruta	B2 tratada	C bruta	
pH	8,14	8,06	8,00	8,10	6,43	8,20	6,97	8,30	–
COD	2468	2645	2657	278	42	776	158	505	mg de C / L
DQO	515	479	467	296	134	1285	1137	163	mg de O ₂ / L
Alcalinidade Total	4995	4953	3903	2898	152	2833	86	2473	mg de CaCO ₃ / L
Nitrogênio amoniacal	1684	1663	1607	1544	385	953	199	575	mg N-NH ₃ / L
Cloreto	4709	4519	4289	3679	1880	2787	2806	1150	mg de Cl / L
Cor aparente	201	194	145	136	6	143	24	249	Units Pt / Co
Cor Real	181	159	121	94	4	65	19	114	Units Pt / Co
Turbidez	182	142	121	115	0	112	0,2	236	NTU
Fóforo Total	9,7	14,9	5,6	3,4	0,13	2,4	0,03	6,8	mg de P / L
SDT	13136	12362	12552	8742	3198	7632	7640	5020	mg / L
SST	234	222	192	244	0	254	126	196	mg / L
Condutividade a 25°C	20,7	21,0	20,6	21,0	17,7	12,9	10,8	7,8	S/cm
Substâncias Húmicas	3054	3343	3243	1424	0	1615	0	1449	mg / L
Abs ₂₅₄	0,973	0,517	0,506	0,822	0,060	0,622	0,070	0,680	nm

Com relação às substâncias húmicas, lixiviados brutos apresentaram elevadas concentrações, porém após tratamento há considerada remoção da cor da amostra, demonstrando correlação entre os parâmetros (PACHECO, 2004). Nos lixiviados tratados não foi encontrada substâncias húmicas provavelmente devido a remoção total das mesmas após tratamento utilizando nanofiltração como polimento.

Sabendo que, a composição do lixiviado muda de acordo com a idade dos aterros, em aterros mais velhos, grande parte do lixiviado formado é composto por produtos orgânicos húmicos e fúlvicos (SANTOS, 2011). Nesse sentido, três amostras brutas do estudo foram analisadas em função dessas frações húmicas e fúlvicas conforme a Tabela 13.

Segundo Rosalém (2007), através da absorbância 254 nm é possível a determinação da quantidade de matéria orgânica, através da análise espectrofotométrica nessa faixa. De acordo com Marmo (2005) apud Rosalém (2007) a presença de COD indica concentração de substâncias húmicas no meio, mas não define a natureza das ligações do carbono no meio. A presença de ligações duplas na molécula de ácido húmico possibilita a absorção de energia na faixa do ultravioleta – UV a 254 nm.

Os valores de COD encontrados na amostra normalmente apresentam valores diretamente proporcionais as Abs em 254 nm, e conseqüentemente maiores são as concentrações de substância húmica nas amostras, pois a matéria orgânica também pode ser medida como COD.

Tabela 13: Concentração de substâncias húmicas das amostras A3 bruta, B1 bruta e C bruta, e suas respectivas frações de ácido húmico e ácido fúlvico.

Amostra	[SH] mg/L
A3 bruta	3243
A3 bruta AH	872
A3 bruta AF	2268
B1 bruta	1424
B1 bruta AH	529
B1 bruta AF	880
C bruta	1449
C bruta AH	571
C bruta AF	836

Do total de substâncias húmicas presentes na amostra: A3 - 27% é correspondente as frações de ácido húmico e 70% as frações de ácido fúlvico; B1 bruta - 37% é correspondente as frações de ácido húmico e 62% as frações de ácido fúlvico; e C - 39% é correspondente as frações de ácido húmico e 58% as frações de ácido fúlvico. Como observado a concentração de ácidos fúlvicos presente no lixiviado é maior que a dos ácidos húmicos.

No estudo de Moravia (2010) também houve a predominância de ácidos fúlvicos na amostra de lixiviado de aterro, caracterizado com 92% do total de substâncias fúlvicas. Fato este, que pode estar associado a idade do aterro/lixão, pois já possuem mais de cinco anos de operação tornando-os locais de disposição considerados “velhos”.

4.2. Toxicidade das amostras nos diferentes organismos

Os organismos-teste utilizados para avaliar a toxicidade devem responder a ação dos agentes tóxicos presentes na amostra. No entanto, respondem de forma diferenciada para mesma amostra analisada.

4 2.1. Toxicidade aguda com o organismo-teste *Lactuca sativa*

Realizou-se 20 ensaios de sensibilidade com NaCl para obtenção da carta controle para as sementes de alface (Figura 29). O valor médio encontrado de sensibilidade da *Lactuca sativa* foi CE50;120h igual a $0,09 \pm 0,03$ mol/L de NaCl.

A utilização de testes de sensibilidade que avaliam a germinação e alongamento radícula em vegetais superiores são indicados para avaliar o potencial de contaminação ambiental dos resíduos e efluentes disposto no meio ambiente, sendo que o teste de alongamento radicular se mostra mais eficientes para detecção da toxicidade (VARNERO et al., 2007; USEPA, 1996).

Ao comparar a toxicidade das amostras de lixiviado bruto e tratado frente a *Lactuca sativa*, observa-se que as cinco amostras de lixiviado bruto proveniente do aterro sanitário apresentam-se mais tóxicas que a amostra bruta coletada no lixão (Figura 30). A menor

toxicidade da amostra C, provavelmente é em função dos valores obtidos nas análises físico-químicas, quase sempre inferiores as outras amostras.

Figura 29: Carta controle da *Lactuca sativa*.

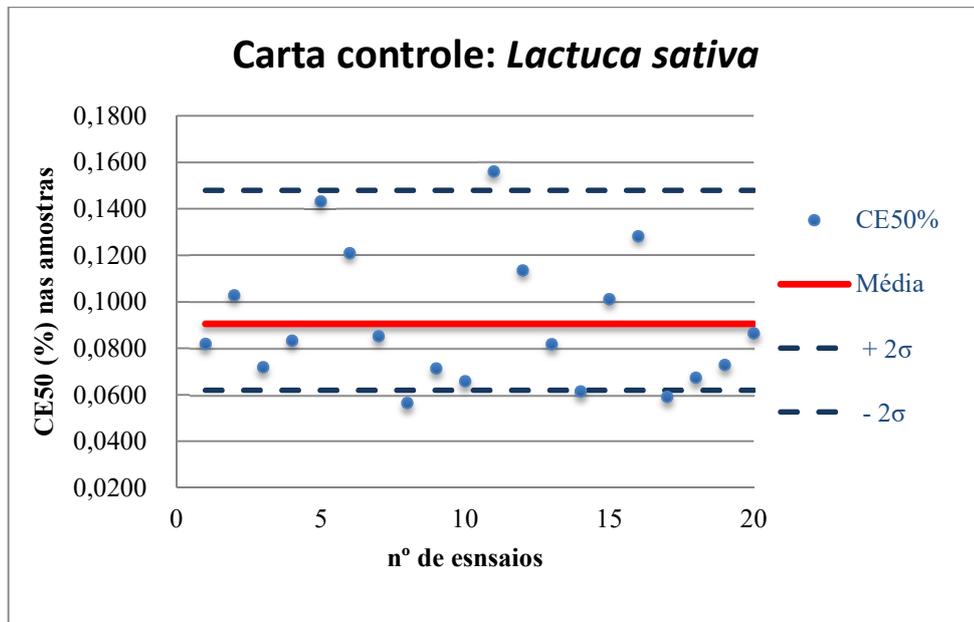
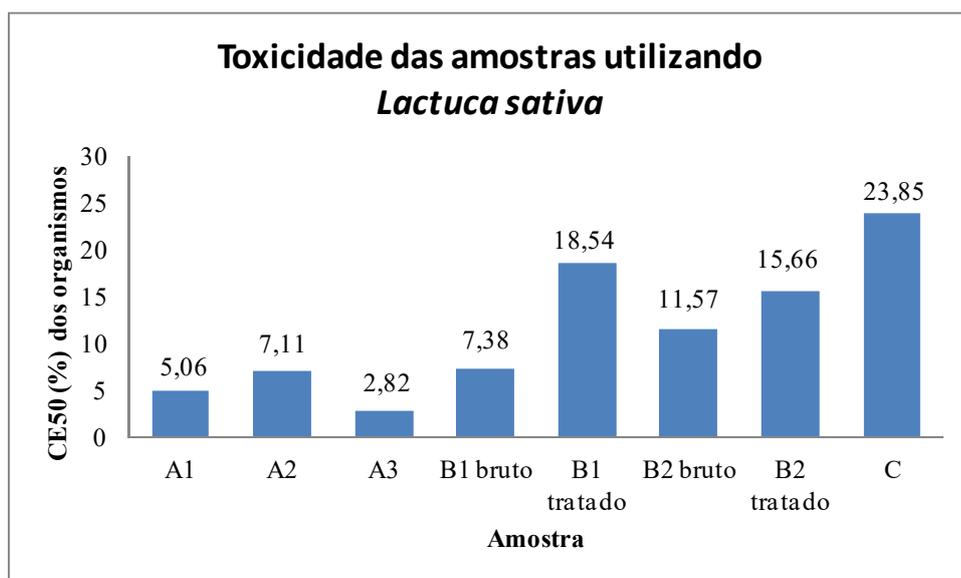


Figura 30: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste *Lactuca sativa*.



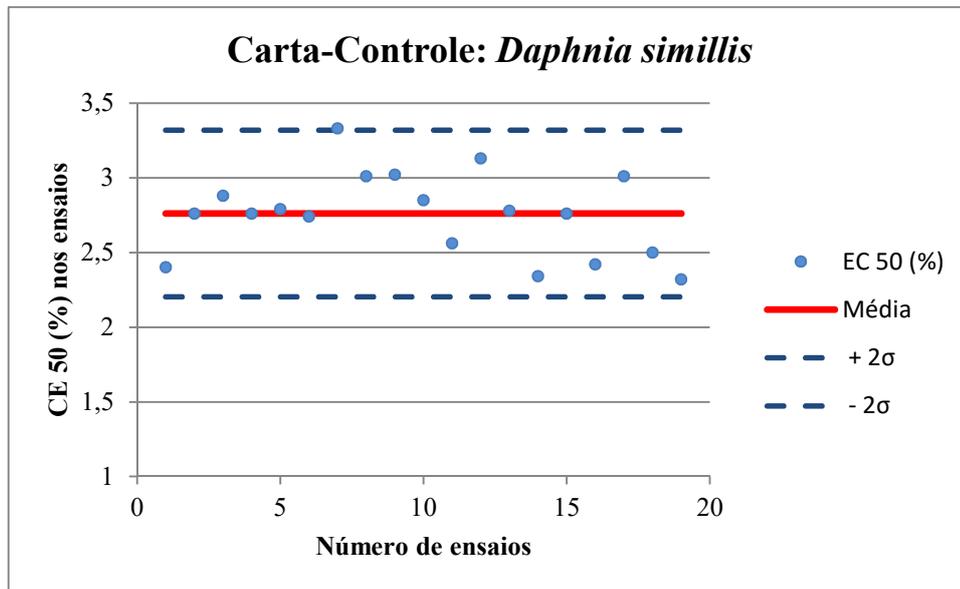
As amostras A1, A2, A3, B1 e B2 brutas apresentaram CE50 igual a 5,06%, 7,11%, 2,83%, 7,38% e 11,57%, respectivamente. As amostras mais tóxicas coincidiram com os resultados encontrados no trabalho de (DIAS, 2013), onde a maior toxicidade do efluente estava diretamente ligada às amostras com a maior concentração de nitrogênio amoniacal, no entanto, não é possível generalizar, com apenas a coleta de uma amostra em cada ponto. Em contrapartida observou-se na amostra C uma CE50 de 23,85%, representando uma toxicidade menor que a encontrada nas duas amostras tratadas B1tratada e B2tratada que obtiveram uma CE50 de 15,66% e 18,54% respectivamente. A relação com a nitrogênio amoniacal também ficou evidente na diferença de toxicidade entre as duas amostras tratadas, porém não explica a menor toxicidade da amostra C.

Durante o processo de tratamento o fósforo foi praticamente removido das amostras B1tratada e B2tratada (0,13 mg de P/L e 0,03 mg de P/L respectivamente), o que não acontece na amostra C que é uma amostra bruta e apresenta 6,8 mg de P/L. Como o fósforo é um macronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, a alta concentração desse elemento na amostra C, quando comparado as amostras tratadas, pode estar mascarando o efeito tóxico do efluente, promovendo o alongamento radicular maior do que em amostras com menor concentração de nitrogênio amoniacal (GARCIA, 1982).

4.2.2. Toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia simillis*

A carta-controle do peixe *Daphnia simillis* já estava pronta quando foi realizado o trabalho. Para a carta controle foram realizados 19 ensaios com cloreto de sódio (Figura 31). O valor médio encontrado de sensibilidade da *Daphnia similis* é CE50;48h igual a $2,76 \pm 0,28$ mg/L de NaCl.

Figura 31: Carta controle da *Daphnia simillis*.

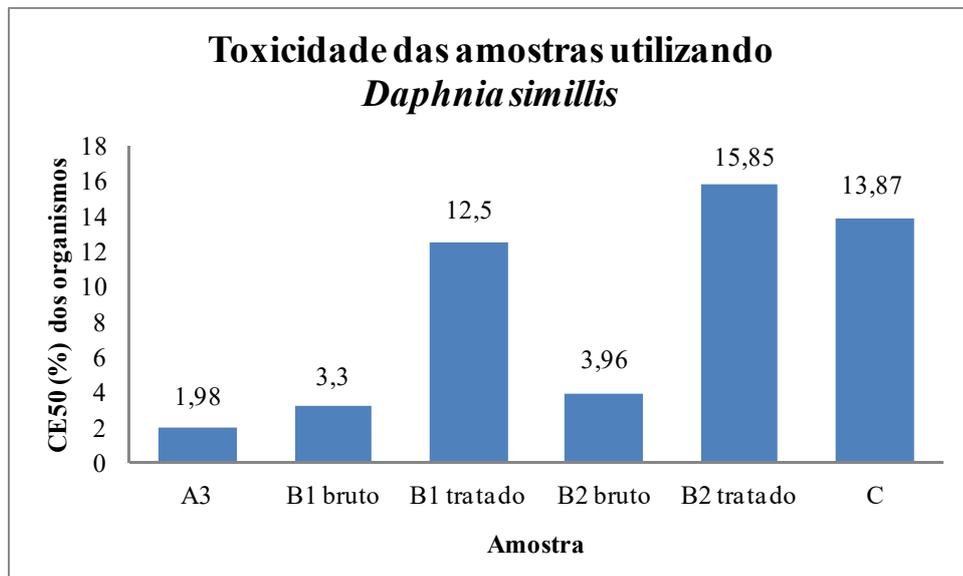


Os valores de CE50 (%) correspondente a cada amostra analisada podem ser verificados na Figura 32. As amostras brutas de lixiviado proveniente de aterro sanitário demonstraram maiores toxicidades quando comparadas a amostra do lixão, assim como, em estudo realizado por Araujo et al. (2010) que avaliou a toxicidade em amostras de lixão, aterro controlado e aterro sanitário de RSU no município do Rio de Janeiro utilizando a *Daphnia simillis*, obtendo valores médios de CE50 de 7, 5%, 4,2% e 29,6% para o aterro controlado, aterro sanitário e lixão, respectivamente. No entanto, neste estudo, foram determinadas C50 para as amostras brutas de 1,98, 3,3 e 3,96 %, demonstrando-se ainda mais tóxicas que as amostras analisadas por Araujo et al. (2010).

Comparando os valores de CE50 das amostras tratadas e brutas (Figura 32), observa-se uma redução da toxicidade em mais de 10% no caso do lixiviado B2.

Não foi possível a realização de ensaios ecotoxicológicos utilizando a *Daphnia simillis* para as amostras A1 e A2 brutas e, por isso, não foram determinados seus respectivos valores de CE50.

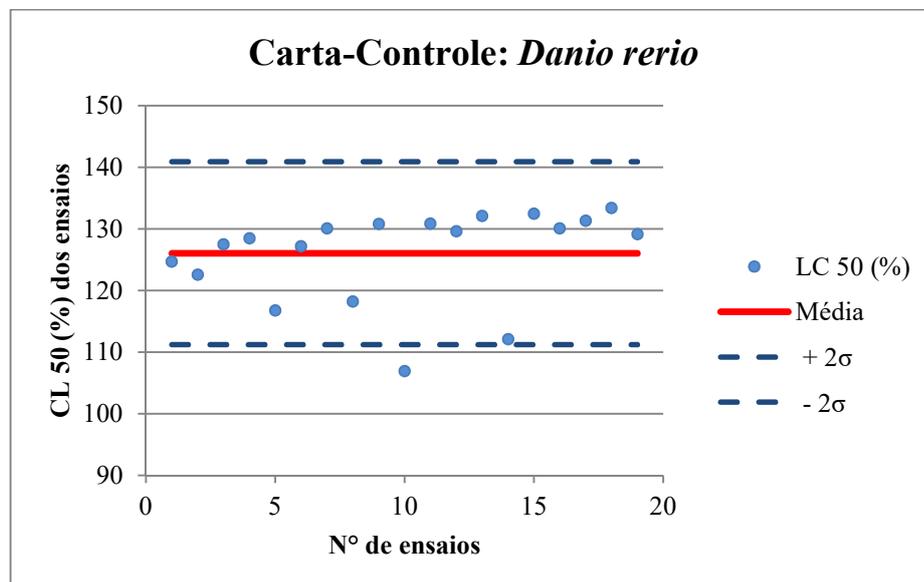
Figura 32: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste *Daphnia simillis*.



4.2.3. Toxicidade aguda com o organismo-teste *Danio rerio*

A carta-control de do peixe *Danio rerio* (Figura 33) já estava pronta quando foi realizado o trabalho. A substância de referência utilizada no laboratório foi o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). O valor médio encontrado de sensibilidade do *Danio rerio* é CL50 igual a $126 \pm 7,43$ mg/L de dicromato.

Figura 33: Carta controle do *Danio rerio*.



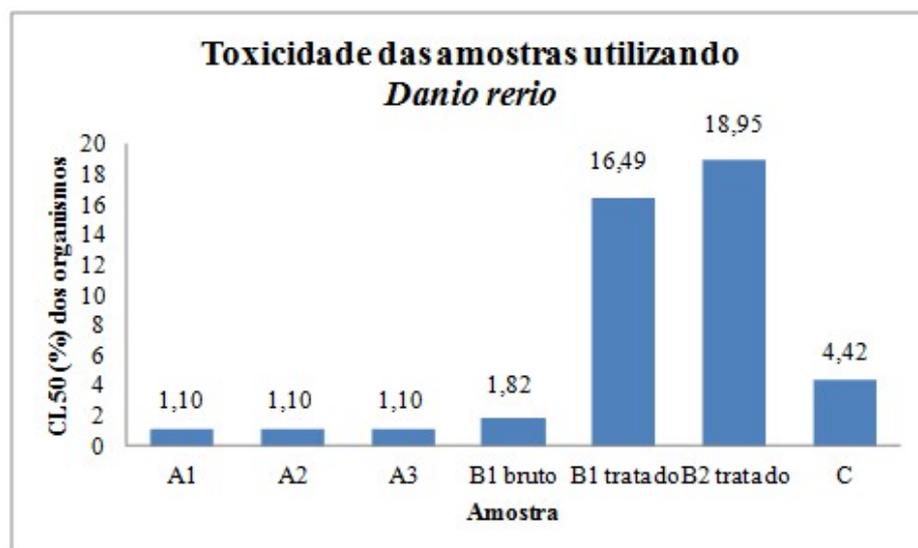
Na Figura 34 observa-se a alta toxicidade das amostras brutas sobre os organismos-teste *Danio rerio* e os valores de CE50 determinados nos lixiviados tratados apresentaram toxicidades semelhantes, demonstrando pouca interferência quanto à época do ano em que foram coletados.

Além do nitrogênio amoniacal, as amostras do lixiviado A, apresentaram altos valores de nitrogênio amoniacal, alcalinidade, substâncias húmicas e cloreto, por exemplo, e por isso, podem estar associados a toxicidade presente na amostra, no entanto, não é possível generalizar devido a falta de amostragem tornando a avaliação pouco confiável.

Alves (2010), também analisou a toxicidade em amostras de lixiviado, obtendo reduções de até 70% da toxicidade do lixiviado bruto proveniente de três regiões do país (Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul) para o tratado, que passou por tratamento de clarificação físico-química com cal, *Air stripping* e correção de pH com CO₂, sendo que após a clarificação os efluentes passaram por tratamento biológico com lodos ativados. No entanto, neste estudo a remoções de toxicidade do lixiviado tratado foi de apenas 15%, caracterizando um lixiviado com elevado potencial de toxicidade, quando comparado ao lixiviado analisado no estudo de Alves (2010).

Não foi possível a realização de ensaios ecotoxicológicos utilizando a *Danio rerio* para a amostra B2 bruta e, por isso, não foi determinado seu respectivo valor de CE50.

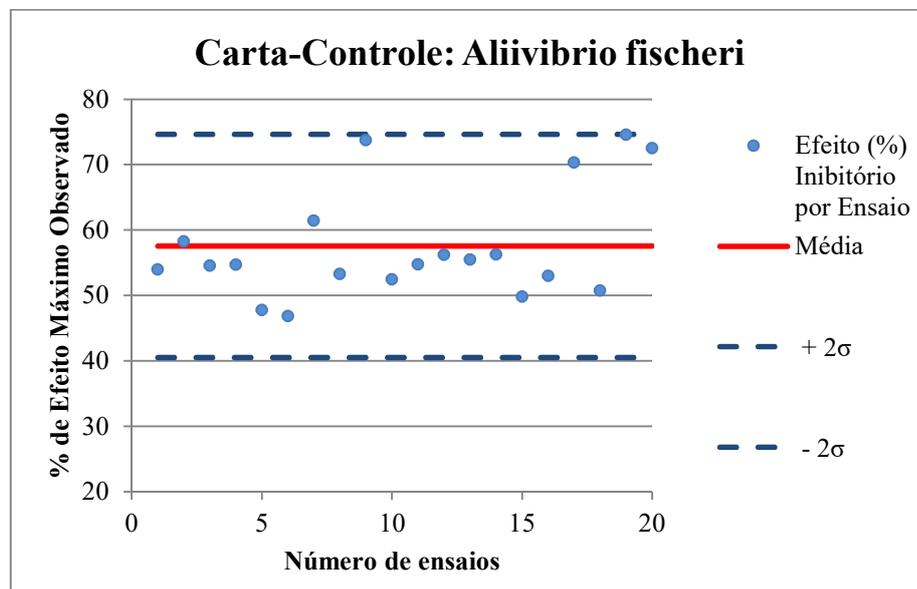
Figura 34: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste *Danio rerio*.



4.2.4. Toxicidade aguda com o organismo-teste *Aliivibrio fischeri*

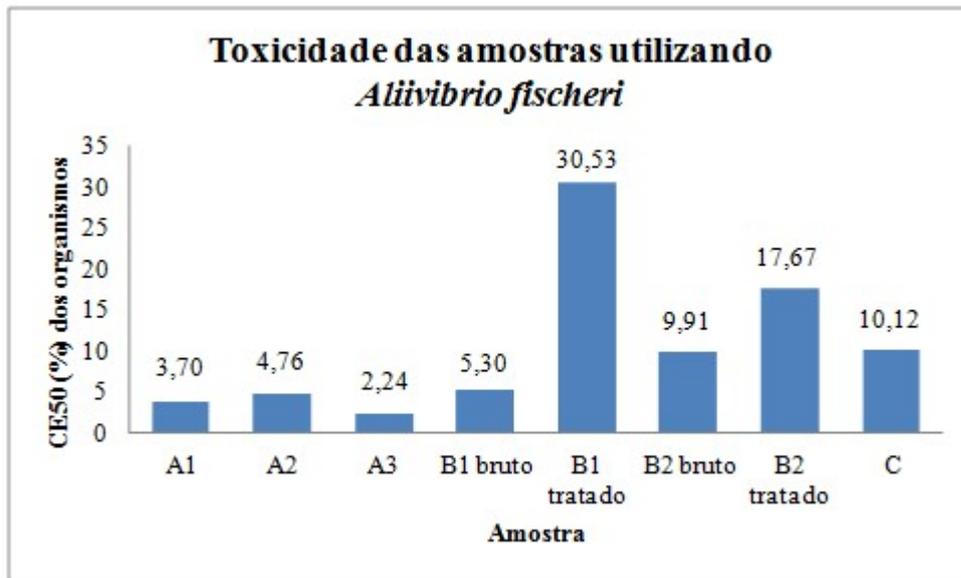
A carta-controle da *Aliivibrio fischeri* (Figura 35) já estava pronta quando foi realizado o trabalho e, a substância de referência utilizada pelo laboratório foi o dicromato de potássio. Foram realizados 20 ensaios para a construção da carta controle. O valor médio encontrado de sensibilidade da *Aliivibrio fischeri* é CE50 igual a $57,58 \pm 8,53$.

Figura 35: Carta controle da *Aliivibrio fischeri*.



Cunha et al. (2012) comparou a toxicidade de lixiviados brutos e tratados provenientes de aterro sanitário localizado no município de Cariacica/ES utilizando a bactéria *Aliivibrio fischeri*, obtendo valores de CE50 entre 13,6 e 28,3% para os efluentes brutos, e as amostras tratadas por coagulação/floculação/precipitação com aplicação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguido por *air stripping* e troca iônica, apresentaram redução de toxicidade em relação a amostra bruta, mas com valores ainda menores (14,6 e 9,9%) aos encontrados neste estudo conforme apresentado na Figura 36.

Figura 36: Valores de CE50(%) dos ensaios de toxicidade aguda das amostras de lixiviado bruto e tratado frente ao organismo-teste *Aliivibrio fischeri*.



4.2.5. Avaliação conjunta dos organismos

As amostras brutas do aterro B apresentam em média valores mais altos de CE50 que o aterro A, ou seja, apresentam menos toxicidade aos organismos-testes. No entanto, ao comparar todas as amostras brutas, no geral, a amostra C apresenta menos toxicidade aos organismos. Provavelmente, esses dados são influenciados por concentrações de elevadas de substâncias húmicas, principalmente, atribuindo maior toxicidade às amostras do lixiviado A. Além disso, a maior toxicidade das amostras A1, A2 e A3 brutas podem estar relacionadas à idade do aterro, pois são provenientes de aterros mais novos.

Ao comparar a mesma amostra de lixiviado, bruta e tratada, percebe-se a redução da toxicidade após o tratamento das amostras, devido a redução da maioria dos parâmetros analisados.

Analisando a Tabela 14, pode-se ainda perceber, no geral, maior toxicidade ao organismo *Danio rerio* e menor toxicidade ao organismo *Lactuca sativa* neste estudo.

Tabela 14: Valores de CE(L)50 obtidos nos ensaios de toxicidade das amostras de lixiviado bruto e tratado com diferentes organismos-teste.

Amostra	Resultados de CE(L)50 (%)			
	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Daphnia simillis</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Aliivibrio fischeri</i>
A1 bruta	5,06	*	1,10	3,70
A2 bruta	7,11	*	1,10	4,76
A3 bruta	2,82	1,98	1,10	2,24
B1 bruto	7,38	3,30	1,82	5,30
B1 tratado	18,54	12,50	16,49	30,53
B2 bruto	11,57	3,96	*	9,91
B2 tratado	15,66	15,85	18,95	17,67
C bruta	23,85	13,87	4,42	10,12

* CE(L)50 não determinados

4.3. Determinação de atividade estrogênica

A EFS, como já mencionado é bastante utilizada para a pré-concentração de amostra, na determinação de micropoluentes, uma vez que muitos pesquisadores obtiveram sucesso ao utilizar esta metodologia. Na literatura é possível observar a necessidade de grande volume de amostra na EFS para amostras menos complexas comparadas ao lixiviado de RSU, como água natural e esgoto doméstico. Tendo em vista essa complexidade, foram necessários alguns testes iniciais para a determinação do tipo de cartucho e o volume de amostra a ser percolado pelo mesmo na EFS, uma vez que, volumes usuais em outras matrizes foram desconsiderados por saturar o cartucho e inviabilizar o processo de extração.

4.3.1. Testes iniciais

Nas primeiras análises, para verificação de atividade estrogênica, a partir do ensaio YES, testes com lixiviado bruto do aterro (A2 bruta) utilizando cartucho STRATA X empregando volumes de extração de 10 e 50 mL foram realizados. Os extratos das amostras não apresentaram atividade estrogênica no ensaio YES, indicando, provavelmente, a presença de substâncias tóxicas ou compostos que inibem o crescimento da levedura *Sacharomyces cerevisiae*. Na Tabela 15, pode-se observar a presença de toxicidade da amostra A2.1 bruta na maioria dos poços, determinada pela Equação 4 e na Figura 37 a curva dose resposta utilizando a amostra A2.1 bruta.

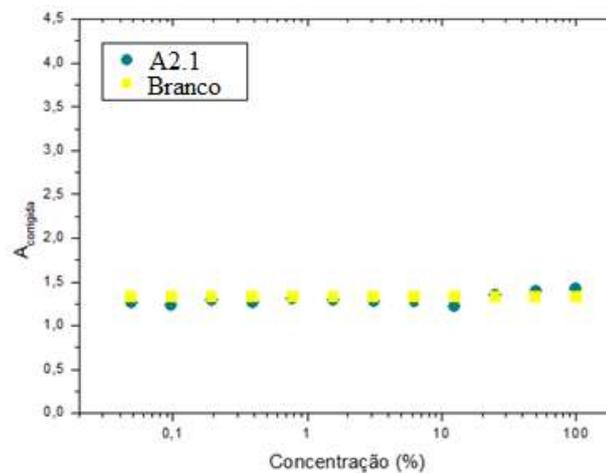
No ensaio YES, como já mencionado, a toxicidade inerente de algumas amostras pode causar um efeito negativo devido a interferentes presentes nas mesmas afetando o crescimento da levedura durante o ensaio, o que pode vir a prejudicar a curva dose resposta. A Tabela 15 demonstra que houve toxicidade em todos os poços da placa.

Tabela 15: Estimativa da toxicidade da amostra A2.1 bruta em cada poço da placa de 96 poços no ensaio YES.

Poço	Toxicidade
1	0,010
2	0,069
3	-0,086
4	-0,115
5	-0,121
6	0,005
7	0,028
8	0,033
9	-0,014
10	-0,001
11	0,002
12	0,026

A inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante o período de incubação do ensaio está associada a presença de toxicidade na amostra estudada. Esse comportamento é comum em amostras ambientais, e ao aplicar a Equação 4 (item 3.5.3.6.) descrita por Frische et al. (2009), pode-se determinar a inibição do crescimento da levedura devido a toxicidade das amostras em vários poços, associados aos valores positivos (poço 1, 2, 6, 7, 8, 11 e 12).

Figura 37: Curva dose-resposta do ensaio YES: amostra A2 bruta com volume de extração de 10 mL.

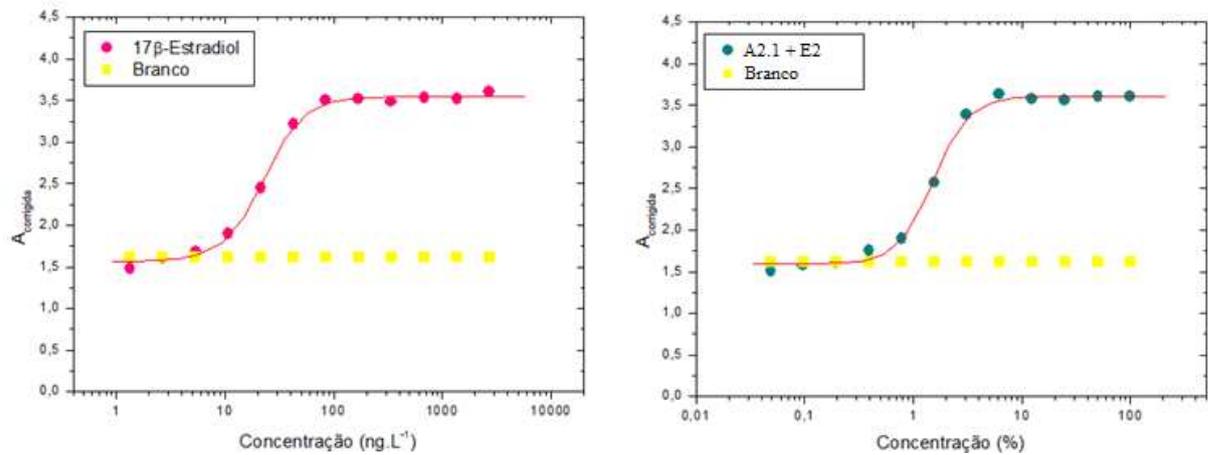


Sabendo da grande probabilidade de presença de atividade estrogênica nas amostras estudadas, devido a diversas substâncias presentes na composição do lixiviado que são consideradas DEs, foi realizado um novo ensaio utilizando a mesma amostra. No entanto, a esta amostra foi adicionada o estrogênio 17β -estradiol nas diluições feitas durante o ensaio, no intuito de verificar se seria possível determinar a atividade estrogênica ou se, mesmo com a dopagem da amostra o teste resultaria em um falso negativo, indicando a presença de interferentes na amostra analisada.

A partir dessas considerações foi determinado o valor de CE50 igual a 42,03%, e, para o controle positivo 17β -estradiol, feito em todos os ensaios, o valor de CE50 foi igual a 22,47%. O valor do CE50 da amostra dopada com o estrogênio 17β -estradiol deveria ser igual ao valor do CE50 da curva dose-resposta do 17β -estradiol, caso não houvesse atividade estrogênica na amostra, ou valor menor, mais provável, em função da toxicidade da amostra uma vez que os lixiviados possuem uma mistura complexa de substâncias, sendo muitas consideradas DEs. Na Figura 38 são apresentadas as curvas dose-resposta do controle positivo obtida no ensaio YES e a curva dose-resposta da amostra A2 bruta utilizando 10 mL (A2.1 bruta) de volume de extração dopada (A2.1 bruta + E_2).

Sendo o valor da CE50, no caso do ensaio YES, a concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da β -galactosidase no ensaio, em relação à curva padrão.

Figura 38: Curvas doses-respostas do ensaio YES: controle positivo e amostra A2 bruta com volume de extração de 10 mL (A2.1 bruta) dopada com E2.



Devido a realização da EFS com pouco volume de amostra para nos ensaios anteriores, foi verificado a presença de atividade estrogênica em outra amostra e com volume de extração de 100 mL (C3) (Figura 39), visando obter resultados mais confiáveis. Contudo, o ensaio não obteve sucesso, mas, também não apresentou toxicidade, demonstrando a presença de interferentes na amostra (Tabela 16).

Figura 39: Curva dose resposta no ensaio YES para a amostra C utilizando 100 mL de volume de extração.

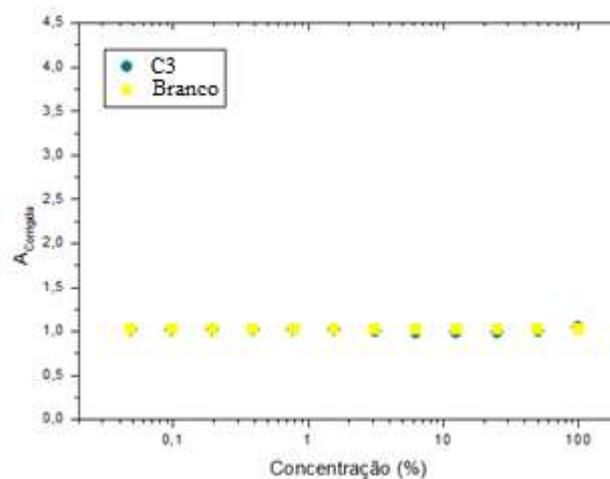


Tabela 16: Estimativa de toxicidade da amostra C3 em cada poço da placa de 96 poços no ensaio YES.

Poço	Toxicidade
1	-0,082
2	-0,029
3	-0,029
4	-0,043
5	-0,025
6	-0,010
7	0,008
8	-0,018
9	-0,013
10	-0,028
11	0,024
12	-0,003

Outros testes utilizando cartuchos acoplados em sequência foram desenvolvidos na EFS, usando cartucho STRATA SAX acoplado aos cartuchos STRATA X e AGILENT. A metodologia em série adotada, utilizando o cartucho STRATA SAX para a remoção de interferentes, foi realizada percolando pelos cartuchos, diferentes volumes de extração (10, 50 e 100 mL), com expectativa de melhores resultados para as extrações com maior volume de amostra.

O resultado dos testes usando STRATA SAX + STRATA X para as amostras C1, C2 e C3 brutas, não apresentaram atividade estrogênica, mesmo na extração com maior volume de amostra de lixiviado bruto, e os testes usando STRATA SAX + AGILENT, apresentaram pequena atividade estrogênica em volumes de 50 mL. Com base nos últimos resultados, foi percebido que a utilização de um volume de 50 mL das amostras analisadas era suficiente, pois foi possível identificar e quantificar os DEs sem saturar o cartucho, no entanto foi preciso o uso de cartuchos mais eficientes. Logo, foi determinado para o estudo, a utilização do cartucho OASIS HLB, que assim como o STRATA X, são cartuchos de fase reversa e possuem sorvente de base polimérica, porém, o STRATA X possui uma cadeia lipofílica menor em comparação ao OASIS HLB. Em ambos os cartuchos, há a adição do grupo pirrolidona, que modifica a polaridade do polímero, trazendo característica hidrofílica à fase estacionária, dessa forma é possível reter grupos que possuam anéis aromáticos e que tenham

características apolares ou pouco polares (WWW.WATERS.COM e WWW.PHENOMENEX.COM).

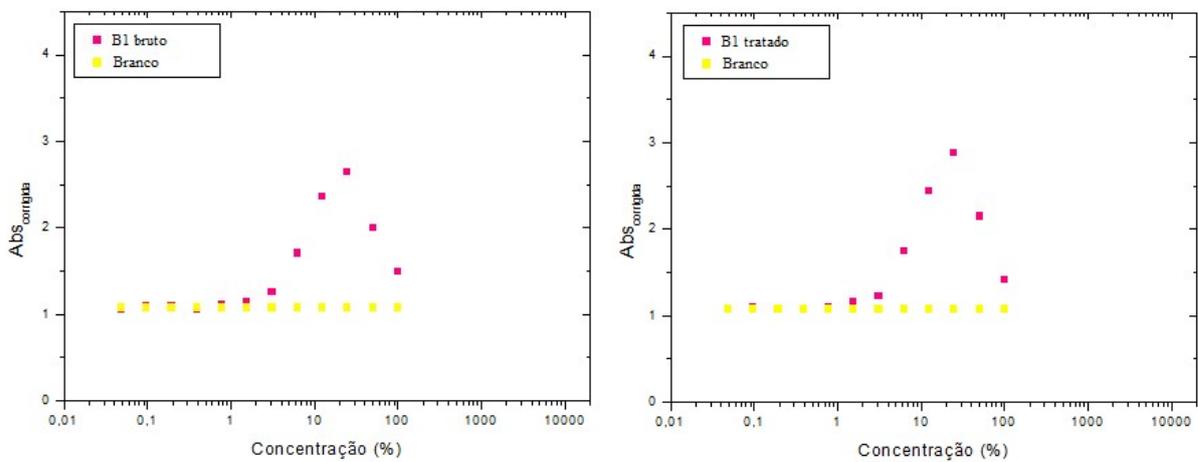
4.3.2. Testes definitivos

Foram realizados testes com cartuchos em sequência, usando STRATA SAX + OASIS HLB acoplados, para determinação de atividade estrogênica nas amostras de lixiviado bruto e tratado, com volume de extração fixo (50 mL). As amostras analisadas com o cartucho OASIS HLB, apenas duas apresentaram atividade estrogênica. Contudo, foram observadas anormalidades no ensaio YES, demonstrando a necessidade de modificações na etapa de preparo das amostras visando à eliminação de interferentes, mesmo utilizando um cartucho de limpeza, visto que, as análises cromatográficas realizadas simultaneamente demonstraram a presença de desreguladores endócrinos com atividade estrogênica.

Dessa forma, após a acidificação da amostra para correção de pH na EFS, foi realizado uma segunda filtração da amostra, devido a sedimentação dos sólidos presentes na mesma ao corrigir o pH. Portanto, após mudança de pH, e consequente filtração, cada amostra analisada foi percolada pelos cartuchos em série: STRATA SAX e OASIS HLB, nessa ordem.

Após alterações no procedimento de preparo de amostra, as amostras A1, A2, A3 e C brutas demonstraram presença de atividade estrogênica, mas nas amostras B1 bruta e tratada, não foi possível a determinação da CE50 em função de interferentes nas mesmas (Figura 40). No entanto, na presença de interferentes, não há crescimento da célula, o que não ocorreu e, além disso, há determinação de estrogênios na mesma amostra pela identificação pela CLAE/FLU.

Figura 40: Curvas doses-respostas no ensaio YES para a amostra de lixiviado B1 bruta e tratada.



Explicações podem ser sugeridas em função da análise das curvas das amostras B1 bruta e tratada, como: a presença de um composto diferente dos DEs presentes na amostra, que possa interferir em algum outro mecanismo impedindo a expressão da β -galactosidase; ou talvez ocorra a expressão da enzima, mas a mesma está sendo consumida por outra substância antes de degradar o CPRG; ou ainda a presença de uma substância que se liga ao receptor de estrogênio, originando um falso negativo.

Segundo a União Européia (COMPREHEND, 2002), a presença dos acetatos de alquilfenóis, suprimem a atividade estrogênica de esteroides e dos próprios alquilfenóis, logo, poderia ser também uma explicação para os fatos ocorridos na amostra B1 bruta e tratada, uma vez que, Baun et al. (2004) identificou a presença de alquilfenóis em lixiviados, além da presença do nonilfenol, que são provenientes da alquilação de fenóis, que é encontrado em lodos de aterro (ARAÚJO, 2015).

Cabe ressaltar que o ensaio YES não foi feito para a amostra B2 bruta e tratada, devido a problemas de contaminação no ensaio YES durante o período de coleta e EFS das mesmas, não sendo possível a execução do ensaio.

Os valores de CE50 das amostras A1, A2, A3 e C brutas são 1,88, 1,77, 1,58 e 19,32, respectivamente, indicando menor toxicidade para a amostra de lixiviado proveniente do lixão. Estas 4 amostras de lixiviado com presença de atividade estrogênica, apresentaram concentração máxima de EQ-E₂ igual a 39,71 ng.L⁻¹.

Segundo Zhang (2009), a atividade estrogênica aumenta com os valores de COD, mas não de forma linear. Analisando os resultados neste estudo, a maior atividade estrogênica realmente se deu nos lixiviados com maiores valores de COD.

As curvas doses-respostas feitas no ensaio YES encontram-se nos anexos 2, 3 e 4.

4.4. Identificação e quantificação do bisfenol A e hormônios E₂, EE₂ e E₃

As concentrações de estriol (E₃), 17β-estradiol (E₂), 17α-estinilestradiol (EE₂) e bisfenol A (BPA) determinadas na CLAE nos testes iniciais, com a utilização de cartuchos e volumes diferentes, obteve concentrações máximas de 0,3858, 0,0415, 0,0044 e 0,7183 mg.L⁻¹. No entanto com a utilização de cartuchos mais eficientes acoplados a cartucho de limpeza, após segunda filtração das amostras, a quantificação dos DEs analisados foram mais elevadas, obtendo concentrações máximas de 1,5679, 2,3626, 1,9569 e 1,5133 mg. L⁻¹, para o E₃, E₂, EE₂ e BPA, respectivamente. Na Tabela 17, podem ser observados a faixa de concentração dos DEs analisados nos testes definitivos.

Tabela 17: Concentrações dos hormônios E₃, E₂ e EE₂ e do BPA determinados na CLAE/FLU.

Amostra	E ₃ (mg. L ⁻¹)	E ₂ (mg. L ⁻¹)	EE ₂ (mg. L ⁻¹)	BPA (mg. L ⁻¹)
A1 bruta	1,5679	2,3626	1,9296	1,3926
A2 bruta	1,2274	1,9902	1,9569	1,3417
A3 bruta	1,0240	1,906	2,0294	1,5133
B1 bruta	0,3304	0,2427	0,0735	0,8806
B1 tratada	0,1257	ND	0,0090	0,0428
B2 bruta	0,3226	0,2375	0,0383	1,2131
B2 tratada	0,1188	0,1808	ND	0,0748
C bruta	0,1250	ND	0,0626	0,0741

* ND = não determinado

Os valores encontrados neste estudo são bastante elevados quando comparados as concentrações máximas de $0,005 \mu\text{g.L}^{-1}$ encontradas para os estrogênios em amostras de esgoto doméstico no Brasil (BILA e DEZOTTI, 2007) tendo em vista a falta de informações dos mesmos em lixiviados de RSU, e $228 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o BPA em lixiviado de aterro de RSU (ASAKURA et al., 2004). Estes valores tornam-se muito baixos em relação aos encontrados no presente estudo, com concentrações mínimas de $0,0090 \text{ mg.L}^{-1}$ ($= 9 \mu\text{g.L}^{-1}$) para os estrogênios e $0,0741 \text{ mg.L}^{-1}$ ($= 74,1 \mu\text{g.L}^{-1}$) para o BPA. A grande diferença da concentração desses DEs se deve, por exemplo, a composição dos resíduos dispostos no aterro, sua idade e época do ano em que as amostras foram coletadas.

No estudo de Asakura et al. (2004), lixiviados de aterros de RSU, denominados aterro A (formado em grande parte por resíduos orgânicos) e aterro B (formado em grande parte por cinzas de incineradores de RSU e resíduos não inflamáveis) foram analisados. O aterro A dividido em 3 blocos diferenciados pelo período de operação que foi de 1979 a 2001, e o aterro B dividido em 7 blocos também diferenciados pelo período de operação que foi de 1984 a 1996.

De acordo com Pessoa et al. (2012) a matéria orgânica e as substâncias húmicas, dentre outras substâncias, são consideradas interferentes que diminuem a disponibilidade dos sítios ativos no material do cartucho, reduzindo a eficiência da extração dos micropoluentes. Portanto, mesmo com altas concentrações de DEs encontrados, esses valores podem ser ainda maiores tendo em vista elevadas concentrações de substâncias húmicas nos lixiviados brutos analisados.

Em relação a presença dos hormônios analisados, das oito amostras de lixiviado, duas não identificaram a presença de E_2 , no entanto, uma é amostra tratada, demonstrando a eficiência do tratamento para a eliminação deste hormônio, e a outra é a amostra de lixiviado proveniente do lixão, que demonstrou características físico-químicas mais discrepantes das do lixiviado de aterro. O EE_2 também não foi quantificado em uma das amostras tratadas e o E_3 e BPA, foram determinados em todas as amostras.

Os limites de detecção e quantificação dos hormônios e BPA são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Valores de LD e LQ para os hormônios e BPA na CLAE/FLU.

DEs	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
E ₃	1,05	5,00
E ₂	1,46	5,30
EE ₂	3,00	9,97
BPA	0,05	2,34

Foi realizado o ensaio de recuperação para os DEs analisados, no entanto, os resultados não foram conclusivos.

As curvas analíticas E₂, EE₂, E₃ e BPA realizadas para as análises cromatográficas se encontram-se no anexo 5.

5. CONCLUSÃO

Com relação a toxicidade aguda, todas as amostras analisadas, brutas e tratadas, demonstraram-se tóxicas para os organismos-teste *Daphnia simillis*, *Danio rerio*, *Aliivibrio fischeri* e *Lactuca sativa*. As amostras tratadas apresentaram menor toxicidade quando comparadas as amostras brutas. As amostras provenientes do aterro mais novo apresentaram toxicidades mais elevadas aos organismos-teste.

Pelas análises físico-químicas, foram determinados altos valores de cloreto, COD, e substâncias húmicas, nas amostras, não podendo atribuir ao nitrogênio amoniacal isoladamente, a possível causa de toxicidade das mesmas, nem, contudo, generalizar e relacionar os valores CE(L)50% determinados com os parâmetros analisados, tendo em vista poucos pontos de amostragem. Dessa forma, não foi possível uma análise mais detalhada quanto os valores obtidos nas análises físico-químicas.

Devido à complexidade da matriz de estudo, foi necessária uma metodologia para otimização da etapa de percolação da amostra na EFS, utilizando cartuchos acoplados, sendo um dos cartuchos utilizado para remoção dos interferentes e o outro para adsorção do analito de interesse. Além, da utilização de um volume de extração suficiente para a determinação do DEs, sem que ocorresse a saturação dos cartuchos ao longo do processo de EFS.

O ensaio YES, mostrou-se eficiente na determinação de atividade estrogênica em algumas amostras. Contudo, em alguns casos, a complexidade da matriz resultou em incertezas nos resultados, uma vez que a interferência de outros compostos químicos presentes na amostra interferiu no resultado da atividade estrogênica. Das as amostras analisadas no ensaio YES, em duas (B1 bruta e tratada) não foi possível a determinação da CE50 em função de interferentes nas mesmas.

As amostras tratadas necessitam de atenção quanto à remoção dos micropoluentes, pois, mesmo com a redução dos DEs através do tratamento, valores consideráveis em mg.L⁻¹ foram verificados nas amostras.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. D. **Estudo comparativo da sensibilidade de dois organismos expostos a efluentes líquidos**. Dissertação - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio. Brasil: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo. 2003.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 21 st Ed. American Public Health Association, Washington, D. C. 2012.
- ARAUJO, C. B. A.; YALLOUZ, A. V.; EGLER, S. Avaliação da toxicidade aguda de *Daphnia similis* a chorumes de diferentes origens e a soluções de metais pesados. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, São Paulo, 2010.
- ARGENTON, A. **Minicurso: Conceitos fundamentais de cromatografia a líquido de alto Desempenho (HPLC)**. Conselho regional de química – IV região. São José do Rio Preto, SP. 2010.
- ASAKURA, H.; MATSUTO, T.; TANAKA, N. Behavior of endocrine-disrupting chemicals in leachate from MSW landfill sites in Japan. **Waste Management**, v. 24, p. 613-622, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS, ABRELPE. **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil, 2014**. 202 p. Disponível em: <http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2014.pdf>, acessado em 12 fev. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR 15411-3. **Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Aliivibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente): método com utilização de bactérias liofilizadas**. Rio de Janeiro, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) NBR 12713 **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda: Método de ensaio com *Daphnia sp* (*Cladorcera*, Crustácea)**. Rio de Janeiro, 23 p., 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) NBR 15088 **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda : Método de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 19 p., 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) NBR 8419 **Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos**. Rio de Janeiro, 7 p., 1992.
- BECK, I. C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. **Chemosphere**, v. 63, n. 11, p. 1870-1878, 2006.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BILA, D. M. **Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -Estradiol pelo Processo de Ozonização**. Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 281 p., 2005.

BISPHENOL A: Information Sheet. Disponível em <<http://www.bisphenol-a.org/pdf/DiscoveryandUseOctober2002.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

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

BRASIL. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. Governo Federal – Ministério do Meio Ambiente. Brasília, DF, 2011.

CABRAL, E. Considerações sobre resíduos sólidos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Fortaleza, p. 1-41. Disponível em: http://www.deecc.ufc.br/Download/Gestao_de_Residuos_Solidos_PGTGA/CONSIDERACOES_SOBRE_RESIDUOS_SOLIDO_S.pdf, acessado em 6 jan. 2016.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAPELINI, M. **Potencialidade e aplicação da prevenção de resíduos de embalagens: abordagem sobre o projeto do produto e o consumo**. Tese – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 273 p. 2007.

CARNEIRO, C. M. T. S.; MURAD, L. H. F. Avaliação da resução da carga tóxica do chorume tratado no aterro metropolitano de gramacho sobre a biota aquática. **XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia** – 25 a 28 de Setembro de 2012. Porto de Galinhas, PE.

CASTILHOS, A. B. **Resíduos sólidos urbanos: Aterro sustentável para municípios de pequeno porte**. PROSAB, ABES/RIMA. Florianópolis, SC, 294 p., 2003.

CASTRILLÓN, L.; FERNANDEZ-NAVA, Y.; ULMANU, M.; ANGER, I.; MARANÓN, E. Physico-chemical and biological treatment of MSW landfill leachate. **Waste Management**, v. 30, p. 228-235, 2010.

CHRISTENSEN, J. B.; JENSEN, D. L.; GRON, C.; FILIP, Z.; CHRISTENSEN, T. H., **Characterization of the dissolved organic carbon in landfill leachate-polluted groundwater**. p. 125–135, 1998.

CHUST^a, R. B. Introdução à cromatografia de líquidos (HPLC). **BOLETIM SPQ**, v. 39, p.43-54, 1990.

COMPREHEND - COMMUNITY PROGRAMME OF RESEARCH ON ENDOCRINE DISRUPTERS AND ENVIRONMENTAL HORMONES. ENV4-CT98-0798, 2002.

COORS, A.; JONES, P. D.; GIESY, J. P.; RATTE, H. T. Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 15, p. 3430-3434, 2003.

COSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições de padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 92, 16 maio 2011. p. 89.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CUNHA, B. M. **Avaliação ecotoxicológica de distintos tipos de efluentes mediante ensaios de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina* e *Lactuca sativa***. Monografia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 79 p., 2011.

CUNHA, J. T.; MIQUELETTI, P. B.; CASSINI, S. T.; SIMAN, R. R. Avaliação da ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário (chorume) submetido a tratamento físico-químico. **XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**. Porto de Galinhas, PE, 2012.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio**. Química Nova na Escola, v. 7, p. 21-25, 1998.

DIAS, N. C. **Adsorção de Nitrogênio Amoniaco de Lixiviado de aterro sanitário em coluna de leito fixo com vermiculita expandida**. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 79 p., 2013.

EC. European Workshop on Endocrine Disrupters. European ED workshop, 18- 20/6/01, Aronsborg (Balsa) Sweden, 18-20 June, 58 p., 2001.

FAN, H.; SHU, H.; YANG, H.; CHEN, W. Characteristics of landfill leachates in central Taiwan. **Science of the Total Environment**, v. 361, p.25-37, 2006.

FLECK, E. **Sistema integrado por filtro anaeróbio, filtro biológico de baixa taxa e banhado construído aplicado ao tratamento de lixiviado de aterro sanitário**. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Porto Alegre, RS, 176 p., 2003.

FOXX HASTEC soluções ambientais completas. Disponível em: <<http://haztec.com.br/solucoes-ambientais-completas/index.php/solucoes/centrais-de-tratamento-de-residuos>>. Acesso em: 9 mai. 2016.

FRISCHE, T.; FAUST, M.; MEYER, W.; BACKHAUS, T. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). **Environ SciPollut**, v. 16, p. 593-603, 2009.

FROLUND, B.; GRIEBE, T.; NIELSEN, P.H. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, n.4, p.755-61, 1995.

GARCIA, L. L. C. **Mineral nutrition of vegetable crops, concentration and accumulation of macronutrients by lettuce plants**. Piracicaba, v. 39, n. 1, p. 455-484, 1982.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOMES, L. P. **Estudos de caracterização e tratabilidade de lixiviados de aterros sanitários para as condições brasileiras**. Projeto PROSAB, ABES, Rio de Janeiro, 360p., 2009.

GOULD, J. C.; LEONARD, L. S.; MANESS, S. C.; WAGNER, B. L.; CONNER, K.; ZACHAREWSKI, T.; SAFE, S.; McDONNELL, D. P.; GAIDO, K. W. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Durham, v. 142, p. 203-214, Mar. 1998.

HE, P.; ZHENG, Z.; ZHANG, H.; SHAO, L.; TANG, Q. PAEs and BPA removal in landfill leachate with Fenton process and its relationship with leachate DOM composition. **Science of the Total Environment**, 407, 879-886. 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas de saneamento 2011 – Manejo de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 218 p., 2010.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 3. ed. [S.l.]: Coordenação Geral de Acreditação, 2010.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A. Toxicity Identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. **Chemosphere**, 52, 85-94, 2003.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia chromatographica**, v.2, n. 1, 13-25. 2010.

KEDDY, C. J.; GREENE, J. C.; BANNELL, M. A. Review of whole-organism bioassays - soil, fresh-water, and fresh water assessment in Canada. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 30, p. 221-251, 1995.

KLAUCK, C. R.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of phytotoxicity of municipal landfill leachate before and after biological treatment. **Brazilian Journal Biology**, v. 75, n. 2, p. 57-62, 2015.

KLAUCK, C. R.; BENVENUTI, T.; SILVA, L. B., RODRIGUES, M. A. S. Aplicação de eletrooxidação no tratamento de chorume de aterro sanitário e avaliação de toxicidade em *Allium cepa*. **4th international workshop advances in cleaner production: “Integrating cleaner production into sustainability strategies”**. São Paulo, 2013.

LANGE, L. C. **Apostila de metodologias para caracterização físico-química de lixiviados de aterros sanitários: parâmetros coletivos não específicos**. Projeto TRATALIX. Belo Horizonte, 58p., 2012.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, R.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LU, F.; ZHANG, H.; CHANG, C.; LEE, D.; He, P.; SHAO, L. SU, A. Dissolved organic matter and estrogenic potencial of landfill leachate. **Chemosphere**, 72, 1381-1386, 2008.

MACOHIN, A. A sustentabilidade na informática - reciclagem e eliminação dos produtos tóxicos das peças de computadores. In: **Anais do seminário de iniciação científica/UNIFA**. Centro Universitário Franciscano UniFAE, Curitiba, 11 p. 2007.

MAGALHÃES, D. N. **Toxicidade no cotratamento de esgoto sanitário e liviviado de aterro sanitário**. Dissertação – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 41 p., 2012.

MAIA, L. S. **Avaliação da degradação de substâncias húmicas presentes em lixiviados de aterros de resíduos sólidos**. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 86 p., 2014.

MANNARINO, C. F. **“Avaliação do tratamento combinado de lixiviado de aterros de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico utilizando indicadores físico-químicos e biológicos”**. Tese – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 110 p., 2010.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 406p., 1994.

MEDEIROS, M. A. C., PELEGRINI, R. **Apostila Química Sanitária II**. Universidade Estadual de Campinas – Centro Superior de Educação tecnológica. São Paulo, 2003.

MILLIGAN, S. R.; BALASUBRAMANIAN, A. V. Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 23-26, 1998.

MONTAGNER, T. A. **Desenvolvimento e validação de método de análise de bisfenol A em amostras de saliva humana por CG-EM**. Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de mestre em química. Campo Grande, MS, 102p., 2013.

MORAES, B. P. **Tratamento biológico de efluentes líquidos e tratamento físico-químico de efluentes líquidos**. Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP - Centro Superior de Educação Tecnológica. 2008.

MORAVIA, W. G. **Avaliação do tratamento de lixiviado de aterro sanitário através de processo oxidativo avançado conjugado com sistema de separação por membranas**. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, MG, 262p., 2010.

NOTÍCIAS de Nova Iguaçu. CTR de Nova Iguaçu é referência no tratamento de resíduos. Disponível em: <http://www.noticiasdenovaiguacu.com/2015/01/ctr-de-nova-iguacu-e-referencia-no-tratamento-de-residuos.html>>. Acesso em: 9 mai. 2016.

OASIS wall chart. The fatest, simplest, and cleanest approach to SPE method development. Disponível em: <http://www.waters.com/oasis.html>>. Acesso em: 1 abr. 2016.

OLIVEIRA, M. M. **Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na Bacia de Jacarepaguá, RJ**. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ- PAMB, 2015. Dissertação de Mestrado.

PACHECO, J.R. **Estudo de certas potencialidades de processos oxidativos avançados para o tratamento de percolado de aterro sanitário**. Dissertação – Universidade Federal do Paraná, Setor de ciências exatas, Curitiba, PR, 81p., 2004.

PESSOA, G. D. P.; SANTOS, A. B. D.; DE SOUZA, N. C. ; ALVES, J. A. C. NASCIMENTO, R. F. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012.

PETERSON, G.L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, p. 422–424, 2006.

POLÍTICA NACIONAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS, PNRS. Presidência da República - Casa Civil. Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm, acessado em: 12 fev. 2016.

PROSAB - PROGRAMA DE PESQUISAS EM SANEAMENTO BÁSICO. **Estudos de caracterização e tratabilidade de lixiviados de aterros sanitários para as condições Brasileiras**. Edital 5, 1º Edição, editora ABES. Rio de Janeiro. ISBN:978-85-7022-163-6. 2009.

REIS, B. G. **Avaliação da Eficiência de Processos Avançados na Remoção de Toxicidade de Lixiviado de Aterro Sanitário**. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, Belo Horizonte, 172 p., 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, F. S. F. **Aplicação da ozonização e do reativo de Fenton como pré-tratamento de chorume com os objetivos de redução da toxicidade e do impacto no processo biológico**. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 90 p., 2004.

ROSA, A. H. **Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfas utilizando-se hidróxido de potássio**. Dissertação – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, 125 p., 1998.

ROSALÉM, S. F. **Estudo de identificação e quantificação de trihalometanos em água de abastecimento**. Dissertação – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 97 p., 2007.

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 15 (3), 241-248, 1996.

SANTOS, C. M. D. **“Evolução dos compostos nos lixiviados dos Aterros Sanitários do Barlavento e Sotavento Algarvio”**. Dissertação – Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 171 p., 2011.

SILVA, A. C. **Tratamento de percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado**. Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 126 p., 2002.

SILVA, R. G. **Remoção de amônia do lixiviado por arraste de ar e caracterização por fracionamento com membrana**. Dissertação – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SILVA, L. L. S. **Utilização de UV/H₂O₂ e osmose inversa para remoção de estrogênios presentes em esgoto sanitário biotratado**. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 164 p., 2016.

SIR, M.; PODHOLA, M.; PATOCKA, T.; HONZAJKOVA, Z.; KOCUREK, P.; KUBAL, M.; KURAS, M. The effect of humic acids on the reverse osmosis treatment of hazardous landfill leachate. **Journal of Hazardous Materials**, 86–90, 2012.

SOUTO, G. D. B. **Lixiviados de Aterros Sanitários Brasileiros – Estudo de Remoção do Nitrogênio Amoniacal por Processo de Arraste de Ar (“stripping”)**. Tese – Universidade de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, 371 p., 2009.

TCHOBANOGLIOUS, G.; THEISEN, H.; Vigil, S. **Integrated Solid Waste Management – Engineering Principles and Management Issues**. IRWIN/McGRAW- HILL, USA, 1993.

TRAN, A. T. K.; HYNE, R. V.; DOBLE, P. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. **Chemosphere**, 67 (5), 944-953. 2007.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological effects test guidelines: Seed germination/root elongation toxicity test**. 1996.

VARNERO, M. T. M.; ROJAS, C. A.; ORELLANA, R. R. **Índices de fitotoxicidad em resíduos orgânicos durante El compostaje**. Nutr. Veg., Temuco, v.7, n. 1, p. 28-37, 2007.

X, polymeric reversed phase detalhe da fase. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>. Acesso em: 1 abr. 2016.

XIANGLI, L.; LI, L.; SHICHUN, Z.; CHONGYU, L.; TIANGANG, L. Determination of bisphenol A in landfill leachate by solid phase microextraction with headspace derivatization and gas chromatography-mass spectrophotometry. **Chinese journal of analytical chemistry**, v. 34 (3), 325-328, 2006.

ZAGGATO, P. A., BERTOLETI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Rima, São Carlos, SP, 472 p., 2008.

ZHANG. H.; CHANG, C.; LU, F.; LEE, D.; He, P.; SHAO, L. SU, A. Estrogenic activity of fractionate landfill leachate. **Science of the Total Environment**, 407, 879-886. 2009.

ZUMACH, R. **Enquadramento de Curso de água: Rio Itajaí-Açu e seus principais afluentes em Blumenau**. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 133 p., 2003.

ANEXO 1: Preparo das soluções do ensaio YES

Meio mínimo - foi preparado adicionando os seguintes reagentes a 1L de água ultrapura: 13,61 g de KH_2PO_4 ; 1,98 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4,2 g de KOH ; 0,2 g de MgSO_4 ; 1mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40mg/50mL de água ultrapura); 50 mg de L-leucina; 50 mg de L-histidina; 50 mg de adenina; 20 mg de L-arginina; 20 mg de L-metionina; 30 mg de L-tirosina; 30mg de L-isoleucina; 30 mg de L-lisina-HCl; 25 mg de L-fenilalanina; 100 mg de ácido glutâmico; 150 mg de L-valina e 375 mg de L-serina.

Solução de glicose - foi preparada a 20% m/v (20 g/100 mL), dissolvendo a glicose em água ultrapura.

Solução de ácido L-aspártico - foi preparada na concentração de $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, com água ultrapura.

Solução de L-treonina - foi preparada na concentração de $24 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (600 mg/25 mL) com água ultrapura

Solução de sulfato de cobre (II) - foi preparada na concentração de 20 mM (0,5g/100mL), com água ultrapura

Solução de vitamina - foi preparada adicionando-se os seguintes reagentes a 180 mL de água ultrapura: 8 mg de tiamina; 8 mg de piridoxina; 8 mg de pantetonato de cálcio; 40 mg de inositol e 20 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL de água ultrapura).

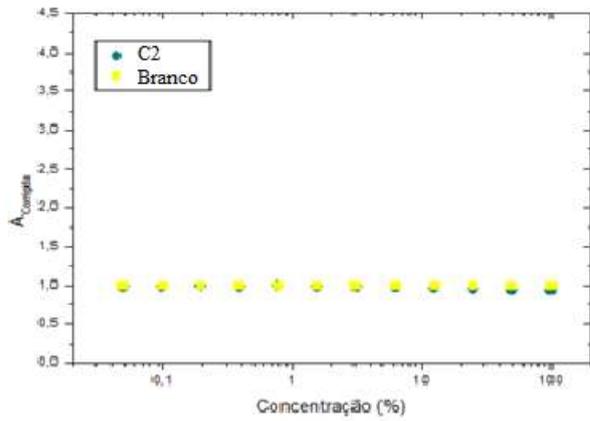
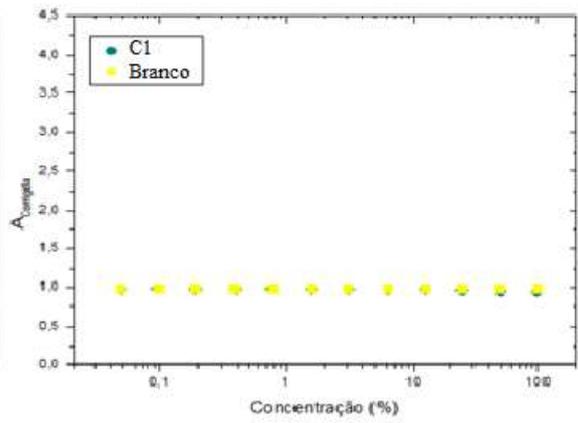
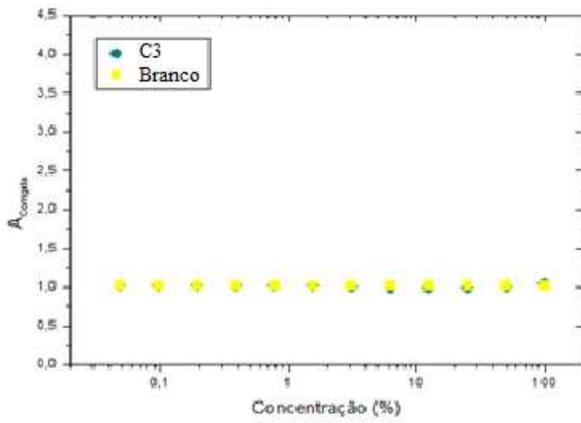
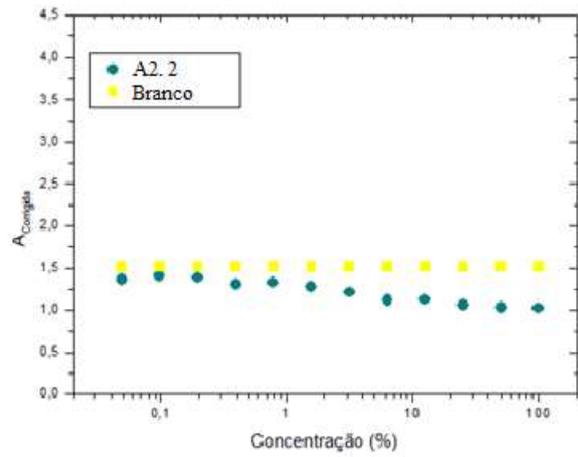
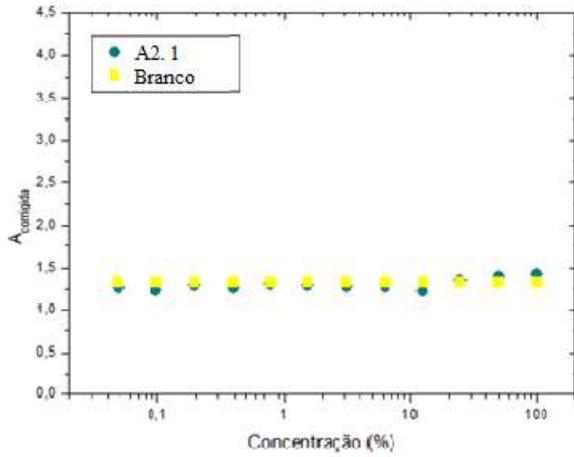
Solução de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) - foi feita na concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando água ultra pura. Foi armazenada em frascos de vidro âmbar estéreis.

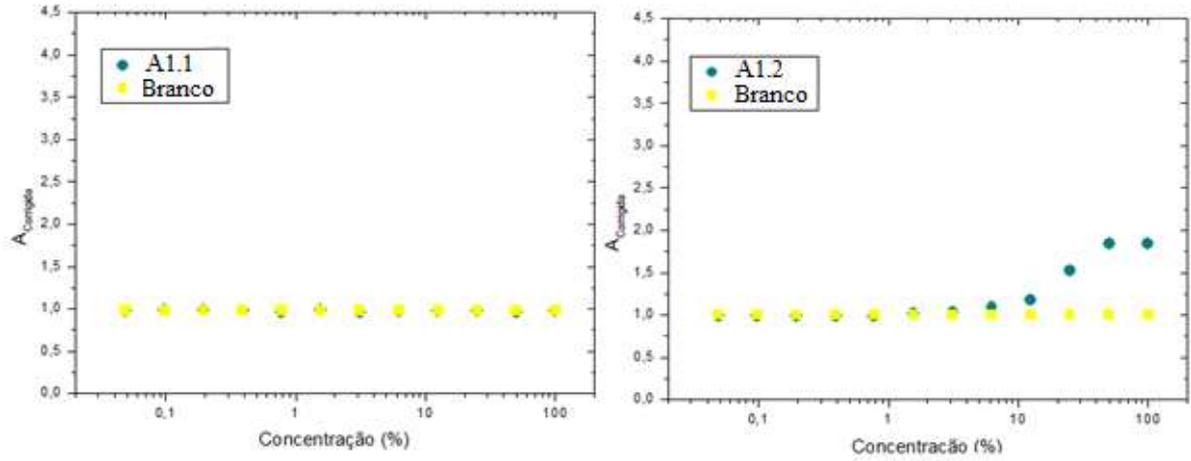
Meio de Cultivo - feito com: 5 mL de solução de glicose; 1,25 mL de solução de ácido L-aspártico; 0,5 mL de solução de vitamina; 0,4 mL de solução de L-treonina; $125 \mu\text{L}$ de solução de sulfato de cobre (II) e 45 mL de meio mínimo.

O meio mínimo, as soluções de glicose, ácido L-aspártico e L-treonina foram esterilizadas em frascos de vidro em autoclave a 121°C por 15 min. e, as soluções de sulfato de cobre (II) e de vitamina foram esterilizadas utilizando-se um kit de filtração estéril, com membrana de 0,2 µm.

As soluções de L-treonina, vitamina e de CPRG foram armazenadas à temperatura de 4°C. Todas as demais foram armazenadas em temperatura ambiente.

ANEXO 2: Curvas doses-respostas obtidas nos testes iniciais: Amostras A2.1, A2. 2, C1, C2 e C3 brutas.



ANEXO 3: Curvas doses-respostas obtidas nos testes iniciais: A1.1 bruta e A1.2 bruta

ANEXO 4: Curvas doses-respostas obtidas no teste definitivo

