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

RODRIGO BRAZ CARNEIRO

**Avaliação do desempenho de biorreatores anaeróbios de leito fixo
ordenado e empacotado para remoção dos antibióticos
sulfametoxazol e ciprofloxacina**

Orientador: Prof. Tit. Marcelo Zaiat

Co-orientador: Prof. Assoc. Álvaro José dos Santos Neto

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP
2019

RODRIGO BRAZ CARNEIRO

**Avaliação do desempenho de biorreatores anaeróbios de leito fixo
ordenado e empacotado para remoção dos antibióticos
sulfametoxazol e ciprofloxacina**

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

Orientador: Prof. Tit. Marcelo Zaiat

Co-orientador: Prof. Assoc. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos
2019

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

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

C257a	<p>Carneiro, Rodrigo Braz</p> <p>Avaliação do desempenho de biorreatores anaeróbios de leito fixo ordenado e empacotado para remoção dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina / Rodrigo Braz Carneiro; orientador Marcelo Zaiat; coorientador Álvaro José dos Santos Neto. São Carlos, 2019.</p> <p>Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019.</p> <p>1. Biodegradação. 2. Cinética. 3. Impactos ecotoxicológicos. 4. Produção de metano. 5. Produtos de transformação. 6. Sorção. I. Título.</p>
-------	---

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **RODRIGO BRAZ CARNEIRO**.

Título da tese: "Avaliação do desempenho de biorreatores anaeróbios de leito fixo ordenado e empacotado para remoção dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina".

Data da defesa: 06/09/2019.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**
(Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Rogers Ribeiro**

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

APROVADO

Prof. Dr. **Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovado

Prof. Dr. **Pedro Sergio Fadini**

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Prof. Dr. **Adriano Luiz Tonetti**

(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Dedico este trabalho a minha mãe Nilza por seu apoio incondicional e por sempre me incentivar no caminho do estudo e da formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por seu infinito amor, bondade e misericórdia por mim, mesmo na minha infidelidade. A Nossa Senhora que sempre passou a frente, me ajudando a ultrapassar os obstáculos. Jesus, grato Lhe sou, porque primeiro me amou!

A minha família, onde verdadeiramente encontro amor e apoio incondicional. A minha mãe, Nilza, que sempre batalhou muito e sozinha para garantir meus estudos. Obrigado mãe pelas palavras que me motivaram a continuar nesse caminho... “Meu filho, nunca pare de estudar, pois eu não tive essa oportunidade...”. Aos meus irmãos Renata, Rosilene e Ricardo que sempre me incentivaram e mesmo sem entender o que faço sei que torcem por mim e pelo meu sucesso profissional. Aos meus sobrinhos Bruno, Maria Luiza, Nicolas, Júlia, Jonatas, Camila e Ricardinho, e a minha sobrinha-neta Helena. Espero que eu possa ser inspiração para vocês em algo e obrigado por me fazerem enxergar a beleza do crescer e amadurecer. Sei que cada um de vocês tem um caminho brilhante pela frente. Contem comigo...

Ao meu orientador professor Zaiat pela dedicação em me orientar, pela confiança depositada em mim na execução deste trabalho, por acreditar no meu potencial enquanto pesquisador, pela amizade, pelas conversas (as descontraídas e as sérias...), pela paciência, enfim, obrigado por ser exemplo e inspiração pra mim (e pra todos) enquanto professor e pesquisador.

Ao meu co-orientador professor Álvaro pelo suporte fundamental durante toda a pesquisa, sobretudo na parte da química analítica. Ao professor Juliano pelo auxílio nos ensaios ecotoxicológicos e por todas as dicas e sugestões durante a qualificação.

A los profesores Juan Lema y Marta Carballa de la Universidad de Santiago de Compostela (España) por su supervisión y confianza en mi trabajo. Aprendí y sigo aprendiendo mucho con ustedes.

A querida moça Mariângela que esteve do meu lado nos momentos mais difíceis. Obrigado por me fazer enxergar meu potencial e por acreditar tanto em mim... por todo amor, apoio, carinho, escuta, entrega, sacrifício, dedicação, amizade, risadas, rimas, oração, companheirismo, cumplicidade, confiança, surpresas, bilhetes (de verdade), bons momentos, #, emojis... enfim, obrigado por TUDO.

Agradeço aos ICs Caio Mukaeda e Carol Sella por serem meus primeiros orientados e pela dedicação no trabalho. Espero ter contribuído para a formação e crescimento profissional de vocês.

A todos do LPB que não só tornam o trabalho mais fácil, mas a vida em geral, pelas conversas, amizade e auxílio nos problemas mais diversos. Agradeço ao Gui GHDO, por toda a ajuda prestada no meu trabalho, sobretudo no início, ao me explicar o tema dos antibióticos e me inspirar a trabalhar com eles... e por toda a fundamental ajuda no massas. Ao Fabrício pela ajuda valiosa nas análises de biomol e por tantas outras dúvidas que me tirou, desde origin até submissão de artigo. Ao Lucas por toda a ajuda com os reatores e problemas diversos no lab, e por permitir que o ambiente de trabalho fique mais leve (ou não né...). Ao Rafael pela ajuda no matlab. A Tanare que apesar do pouco tempo de convívio foi fundamental na análise dos produtos de degradação. A Cris pela amizade e pela ajuda desde sua IC até hoje, seja para aprender a fazer gráfico no origin, montar reator, calibrar um ritter, fazer um perfil ou para dar uma carona. A Vanessa também que quebrou tantos galhos ao longo deste caminho. A Mayara e Bruna pela ajuda com os ensaios de ecotox. Difícil aqui citar toda a ajuda (pequena ou grande) que tive ao longo dessa pesquisa, e não foi pouca, e todos amigos que tenho e tive a honra de conviver no lab - Alana, Alejandra, Ana Flávia, Camila, Carla, Carol Granato, Cebola, Clara, Dago, Daniel, Drika, Du, Elias, Elis, Felipe, Fiaz, Fran, Gabriel, Giz, Guilherme, Heitor, Henrique, Inaê, Inês, Jack, Jean, Jeny, Jéssica, Ju, Karl, Kiemi, Laís, Leandro, Lili, Luana, Luciana, Mara, Marcus, Mariê, Marina, Matheus, Mirabele, Mirian, Moara, Monstro, Murilo, Natália, Pâmela, Paulo, Rachel, Rafa, Rafaely, Raissa, Renata, Sami, Simone, Tainá, Thais, Valéria, Vivian, Vuitik, Will, Williane..., a turma é grande e já peço perdão se deixei de citar alguém. Reconheço o quanto sozinho não seria capaz de fazer nada e o quanto trabalhar em grupo faz toda a diferença!

Às estimadas técnicas do LPB Carol, Janja, Elo e Bel por nos socorrerem sempre nas mais diversas dificuldades analíticas, operacionais e administrativas. Agradeço especialmente a Carol pela inestimável ajuda com as análises e operação do nosso querido massas, com as amostras, discussão de resultados e apresentação de trabalho no congresso. Obrigado Elo por todo o suporte nas análises de microscopia e biologia molecular, e pela apresentação dos trabalhos no congresso. Agradeço também ao técnico Guilherme do IQSC pela valiosa ajuda na detecção dos produtos de degradação.

A toda la gente de Biogroup por darme la bienvenida tan bien, por su amistad, momentos de relajación y seriedad en el trabajo. Pude aprender mucho con vosotros y echo de menos la convivencia – Adrián, Alba Pedrouso, Alba Roibás, Alberte, Andrea Arias, Andrea Fra, Andrés, Antón, Chechu, Fernando, Fran, Gaiimme, Lidia, Lucía Argiz, Lucía Gomes, María, Miguel Martínez, Miguel Mauricio, Nieves, Paula, Riccardo, Silvia, Thelmo, Viola, Yolanda. Agradeço especialmente a Lorena González pela acolhida no laboratório e pelo auxílio

fundamental no meu projeto. Obrigado por toda ajuda com as análises, apresentações, reuniões, artigos, congresso e pela amizade. Gracias David por toda la ayuda con las analíticas y la operación del reactor. Obrigado Guilherme e Iana pela amizade, ajuda e por também me fazerem sentir mais em casa. Gracias a todo el soporte técnico - Mar, Mónica, Iria, Rosa, Ovidio y Sonia. Gracias a todos por todo!

Aos grandes amigos / irmãos que DEUS me deu, seja em Itajubá, São Carlos, Pederneiras ou Santiago de Compostela. Muito difícil citar nomes aqui, pois são muitos que compartilham da minha vida e são suporte para várias coisas, mas uma menção especial a Mineiro, Felipin, Edimilson, Cristiano, Hebert, Amanda, Lorhan, Mito, Javi e Gianni. Obrigado por ser família para mim nos momentos que eu mais precisei. Nem o tempo ou lugar podem nos separar...

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento, em especial Rose, Sá e Priscila, pelo excelente atendimento. A Silvana e ao Fernando por serem tão prestativos. A todos funcionários também que cuidam da faxina, especialmente Fátima e Andreia. Obrigado por cada “bom dia” sincero.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2015/04427-4, 2015/06246-7 e 2017/13066-0, pelo fornecimento da bolsa de doutorado, bolsa de BEPE e auxílios financeiros complementares na execução da pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Gratidão!!!

RESUMO

CARNEIRO, R. B. **Avaliação do desempenho de biorreatores anaeróbios de leito fixo ordenado e empacotado para remoção dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina.** 2019. 248 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A biodegradação de antibióticos nos sistemas usuais de tratamento biológico de esgotos domésticos geralmente não é satisfatória e sua presença nas águas residuárias e de abastecimento se agrava pelo fato de esses micropoluentes emergentes promoverem o desenvolvimento e espalhamento de genes de resistência no ambiente. Diante deste contexto, este estudo buscou avaliar a remoção dos antibióticos sulfametoxazol (SMX) e ciprofloxacina (CIP), em duas configurações de reatores anaeróbios de leito fixo - ordenado (RALFO) e empacotado (RALFE). Os reatores atingiram ótimo desempenho na remoção de DQO (93 ± 2 %), SMX (93 ± 4 %) e CIP (85 ± 10 %), aplicando esgoto lab-made e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 h. O RALFO mostrou maior potencial de aplicação em termos operacionais e econômicos, uma vez que apresentou menor quantidade de material suporte e performance equivalente ou superior comparado ao RALFE. A redução do TDH para 4 h levou a diminuição da eficiência de remoção de DQO (79 ± 6 % no RALFE e 88 ± 5 % no RALFO), SMX (69 ± 7 % no RALFE e 81 ± 7 % no RALFO) e CIP (66 ± 8 % no RALFE e 64 ± 8 % no RALFO), possivelmente devido à diminuição do tempo de contato substrato-biomassa no biofilme. A aplicação de esgoto doméstico como substrato de alimentação dos reatores em TDH de 12 h levou a uma queda da eficiência do sistema - DQO (80 ± 7 %), SMX (77 ± 9 % no RALFE e 73 ± 13 % no RALFO), e CIP (67 ± 19 % no RALFE e 72 ± 14 % no RALFO), devido à alteração da comunidade microbiana no leito dos reatores, com a redução na população de arqueias metanogênicas, sobretudo hidrogenotróficas, e de bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, associadas à biodegradação dos antibióticos. A diminuição do TDH não impactou na constante cinética de decaimento dos compostos, porém a concentração residual resultante foi maior. Com esgoto doméstico, as constantes cinéticas de remoção foram reduzidas, o que denota a diminuição da capacidade de biodegradação dos fármacos. A remoção de SMX e CIP foi praticamente devida a biotransformação, sendo que para a CIP a remoção foi influenciada pelo mecanismo de sorção na biomassa, dada pelo alto $\log K_D$ obtido (2,6 a 2,8 L kg⁻¹SS). O efluente produzido nos reatores não apresentou potencial ecotoxicológico agudo e crônico sobre *Chironomus sancti-caroli*, nem atividade antimicrobiana sobre os microrganismos *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* e *Escherichia coli*. A análise das estruturas moleculares dos produtos de transformação identificados revelou que estes mantiveram a estrutura da quinolona e da sulfonamida intacta, podendo apresentar bioatividade residual. A avaliação da biodegradação de SMX e outros micropoluentes orgânicos em condição acidogênica mostraram que as diferentes etapas da digestão anaeróbia podem atuar de forma distinta sobre a biotransformação dos compostos, devido a mecanismos enzimáticos e microrganismos específicos de cada etapa. Os resultados alcançados neste estudo evidenciam o potencial de reatores anaeróbios de leito fixo na remoção de compostos farmacêuticos presentes no esgoto, notadamente os antibióticos sulfonamidas e fluoroquinolonas, constituindo uma barreira primária na dispersão desses micropoluentes no ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Biodegradação. Cinética. Impactos ecotoxicológicos. Produção de metano. Produtos de transformação. Sorção.

ABSTRACT

CARNEIRO, R. B. **Performance evaluation of anaerobic structured and packed bed bioreactors for sulfamethoxazole and ciprofloxacin antibiotics removal.** 2019. 248 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The biodegradation of antibiotics in usual biological sewage treatment plants is generally not satisfactory and their presence in wastewater and water supply is aggravated by the fact that these emerging micropollutants promote the development and spread of resistance genes in the environment. In this context, this study aimed to evaluate the removal of sulfamethoxazole (SMX) and ciprofloxacin (CIP) antibiotics in two configurations of anaerobic fixed bed reactors - structured (ASBR) and packed (APBR). The reactors achieved high performance in the removal of COD ($93 \pm 2 \%$), SMX ($93 \pm 4 \%$) and CIP ($85 \pm 10 \%$), applying lab-made sewage and hydraulic retention time (HRT) of 12 h. ASBR showed greater potential of application in operational and economic terms, since it presented smaller amount of support material and equivalent or higher performance compared to APBR. The HRT reduction to 4 h led to a decrease in the removal efficiency of COD ($79 \pm 6 \%$ in APBR; $88 \pm 5 \%$ in ASBR), SMX ($69 \pm 7 \%$ in APBR; $81 \pm 7 \%$ in ASBR) and CIP ($66 \pm 8 \%$ in APBR; $64 \pm 8 \%$ in ASBR), likely due to the smaller time of substrate-biomass contact in the biofilm. The application of domestic sewage as a feed substrate for the reactors in HRT of 12 h led to a decrease in the system performance – COD ($80 \pm 7 \%$), SMX ($77 \pm 9 \%$ in APBR; $73 \pm 13 \%$ in ASBR), and CIP ($67 \pm 19 \%$ in APBR; $72 \pm 14 \%$ in ASBR), due to the alteration of the microbial community in the reactors bed, since it was observed a drastic reduction in the population of methanogenic archaea, mainly hydrogenotrophic, and of bacteria of the genus *Clostridium* and *Bacillus*, associated to the antibiotics biodegradation. The HRT decrease did not affect the apparent removal kinetic constant of the compounds but resulted in higher effluent residual concentration. Applying domestic sewage, the removal kinetic constants were reduced, indicating the decrease of the pharmaceutical's biodegradation capacity. The SMX and CIP elimination was practically due to biotransformation, but CIP removal was influenced by the sorption mechanism onto the biomass, since a high $\log K_D$ (2.6 to 2.8 L kg⁻¹SS) was obtained. The effluent from the reactors neither presented an acute and chronic ecotoxicological potential on *Chironomus sancticaroli* nor antimicrobial activity on the microorganisms *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* and *Escherichia coli*. The analysis of the molecular structures of the identified transformation products revealed that they maintained the structure of quinolone and sulfonamide intact and could present residual bioactivity. The evaluation of the SMX and other organic micropollutants biodegradation during acidogenesis showed that each stage of anaerobic digestion can act differently on the biotransformation of the compounds due to enzymatic mechanisms and specific microorganisms of each stage. The results obtained in this study proved the potential of fixed bed anaerobic bioreactors in the removal of pharmaceutical compounds present in sewage, especially the sulfonamides and fluoroquinolones antibiotics, and represent a primary barrier to the dispersion of these micropollutants into the environment.

KEYWORDS: Biodegradation. Kinetics. Ecotoxicological impacts. Methane production. Transformation products. Sorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Origem e principais rotas de contaminação de antibióticos de uso humano e veterinário	50
Figura 2 - Estrutura química geral das sulfonamidas (a) e do sulfametoxazol (b).....	52
Figura 3 - Esquema do equilíbrio de dissociação das sulfonamidas	52
Figura 4 - Distribuição das espécies químicas de SMX de acordo com o pH do meio.....	53
Figura 5 - Boxplot da concentração afluenta (Afl.), efluente (Efl.) e eficiência de remoção de SMX nas estações de tratamento de esgoto referente aos dados apresentados na Tabela 1	55
Figura 6 - Estrutura química geral das quinolonas (a) e da ciprofloxacina (b)	56
Figura 7 - Esquema de protonação e desprotonação para fluoroquinolonas	57
Figura 8 - Distribuição das espécies químicas de CIP de acordo com o pH do meio	57
Figura 9 - Boxplot da concentração afluenta (Afl.), efluente (Efl.) e eficiência de remoção de CIP nas estações de tratamento de esgoto referente aos dados apresentados na Tabela 2....	59
Figura 10 - Principais etapas da digestão anaeróbia de matéria orgânica complexa.....	67
Figura 11 - Faixas de remoção encontradas na literatura para vários MPOs em sistemas biológicos anaeróbios. Detalhes são fornecidos nas Tabelas 4 e 5	68
Figura 12 - Potenciais metabólitos formados a partir da biodegradação aeróbia de SMX	73
Figura 13 - Metabólito da biodegradação de SMX identificado em condições anaeróbias e aeróbias	73
Figura 14 - Estruturas moleculares propostas para os produtos de transformação de SMX identificados em condição anaeróbia sulfetogênica	74
Figura 15 - Estruturas moleculares propostas para os produtos da biodegradação de CIP pela cultura isolada <i>Thermus sp.</i>	74
Figura 16 - Produtos de biotransformação de CIP em condição anóxica sem alteração da molécula de fluoroquinolona.....	75
Figura 17 - Estruturas propostas dos produtos de biotransformação de CIP identificados em condição anaeróbia sulfetogênica.....	75
Figura 18 - Esquema das etapas experimentais adotadas na pesquisa	82
Figura 19 - Desenho esquemático das duas configurações de reatores propostos – RALFE e RALFO.....	83

Figura 20 - Reatores de leito fixo empacotado (a) e ordenado (b) previamente à inoculação da biomassa	84
Figura 21 - Matrizes cilíndricas de espuma de poliuretano utilizadas no RALFE – sem espiral (a) e com espiral (b).....	84
Figura 22 - Tiras prismáticas de EPU utilizadas no RALFO.....	85
Figura 23 - Grânulos do reator UASB da avícola Dacar (a); espuma em contato com a biomassa (b); reatores após imobilização da biomassa (c).....	86
Figura 24 - Estrutura química dos padrões internos $^{13}\text{C}_6\text{-SMX}$ (a) e CIP-D ₈ (b).....	90
Figura 25 - Cromatograma de íon extraído em esgoto lab-made fortificado com 800 ngSMX L ⁻¹ (a) e 3 µg $^{13}\text{C}_6\text{-SMX}$ L ⁻¹ (b)	92
Figura 26 - Cromatograma de íon extraído em esgoto lab-made fortificado com 800 ngCIP L ⁻¹ (a) e 3 µgCIPD ₈ L ⁻¹ (b)	92
Figura 27 - Curvas analíticas e ajuste linear obtido para os antibióticos SMX (a) e CIP (b) em esgoto lab-made	93
Figura 28 - Cromatogramas de massa em perspectiva referentes a curva analítica do SMX..	94
Figura 29 - Desenho esquemático dos pontos laterais de coleta de amostra para o perfil cinético espacial	98
Figura 30 - Reator diferencial (a) e desenho esquemático das partes constituintes do mesmo (b)	101
Figura 31 - Esquema do procedimento adotado para a identificação dos produtos de degradação de SMX e CIP no ensaio em batelada	104
Figura 32 - Ciclo de vida do gênero <i>Chironomus</i> sp. A – massa ovígera, B - larvas, C - pupa (1 – recente empupamento e 2 – pupa madura) e D- adultos (fêmea à esquerda e macho à direita).....	106
Figura 33 - <i>Allonais inaequalis</i>	106
Figura 34 - Cultivo dos organismos-teste – bandejas de <i>Chironomus sancticaroli</i> (a) e frascos de <i>Allonais inaequalis</i> (b).....	107
Figura 35 - Organismos-teste utilizados nos ensaios agudos observados com estereomicroscópio - <i>Chironomus sancticaroli</i> (a) e <i>Allonais inaequalis</i> (b).....	107
Figura 36 - Frascos usados na preparação dos ensaios agudos e crônicos (a); detalhe para aeração nos frascos utilizados nos ensaios crônicos (b)	108
Figura 37 - Procedimento do ensaio de atividade antimicrobiana de SMX e CIP na amostra afluyente dos reatores sobre os microrganismos <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Brevundimonas</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp. e <i>Escherichia coli</i>	110

Figura 38 - Preparo das placas de petri para o ensaio de atividade antimicrobiana de SMX e CIP na amostra efluente dos reatores sobre os microrganismos <i>Ochrobactrum sp.</i> , <i>Brevundimonas sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> e <i>Escherichia coli</i>	111
Figura 39 - Aparato experimental do reator hidrolítico / acidogênico	112
Figura 40 - Esquema do procedimento de extração de MPOs da fase sólida por ultrassom com solventes e posterior concentração em SPE e detecção por GC / LC – MS/MS.....	117
Figura 41 - Desenho esquemático do ensaio biótico em batelada para avaliação do efeito do pH sobre a remoção dos MPOs.....	121
Figura 42 - Métodos para concentração das enzimas do lisado celular – coluna de dessalinização PD10 (a) e membrana de ultrafiltração (b).....	122
Figura 43 - Representação esquemática do ensaio para medição da atividade enzimática da hexoquinase.....	123
Figura 44 - Curva analítica para determinação da atividade enzimática da hexoquinase	124
Figura 45 - Resposta ao estímulo degrau nos reatores de leito fixo livres de biomassa - Curva F no RALFE (a) e no RALFO (b) e Curva E ₀ no RALFE (c) e no RALFO (d).....	125
Figura 46 - Variação temporal da DQO afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de I a IV	127
Figura 47 - Variação temporal da concentração de SMX afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases II e IV	128
Figura 48 - Variação temporal da concentração de CIP afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases III e IV	128
Figura 49 - Boxplot da remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a IV	130
Figura 50 - Variação temporal da composição do biogás (a); produção volumétrica e vazão molar de CH ₄ (b); e rendimento de CH ₄ (c) nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a IV.....	132
Figura 51 - Boxplot da produção volumétrica, vazão molar e rendimento de CH ₄ nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a IV	134
Figura 52: Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores para as Fases de I a IV. As linhas correspondem ao ajuste do modelo cinético de primeira ordem com concentração residual obtido por meio do software OriginPro 8.6.....	136
Figura 53 - Variação temporal da DQO afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de IV a VII.....	141

Figura 54 - Variação temporal da concentração de SMX afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de IV a VII	142
Figura 55 - Variação temporal da concentração de CIP afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de IV a VII	142
Figura 56 - Boxplot da remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores RALFE e RALFO para as fases de IV a VII	143
Figura 57 - Relação entre carga removida de DQO e a carga removida de SMX (a) e CIP (b) dos reatores RALFE e RALFO. Linhas pontilhadas correspondem a correlação linear entre as variáveis.....	146
Figura 58 - Variação temporal da composição do biogás (a); produção volumétrica e vazão molar de CH ₄ (b); e rendimento de CH ₄ (c) nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de IV a VII.....	148
Figura 59 - Boxplot da produção volumétrica, vazão molar e rendimento de CH ₄ nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de IV a VII	150
Figura 60 - Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores para as Fases de IV a VII. As linhas correspondem ao ajuste do modelo cinético de primeira ordem com concentração residual obtido por meio do software OriginPro 8.6	152
Figura 61 - Conteúdo de biomassa suspensa e aderida em gramas de sólidos suspensos voláteis e fixos no leito dos reatores RALFE e RALFO.....	157
Figura 62 - Perfil temporal de SMX e CIP obtido do ensaio de adsorção em reatores diferenciais	160
Figura 63 - Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e abundância relativa (AR) para os domínios Bacteria e Archaea nas amostras de inóculo, e nos reatores alimentados com esgoto lab-made e com esgoto doméstico.....	164
Figura 64 - Abundância relativa de gêneros para os domínios Bacteria e Archaea encontrados nas amostras de inóculo, e nos reatores alimentados com esgoto lab-made e esgoto doméstico. Foram selecionados somente os gêneros com AR > 1 % em pelo menos uma das amostras.....	166
Figura 65 - Comparação entre as amostras do RALFE e RALFO alimentado com esgoto lab-made para os gêneros dos domínios Bactéria e Archaea. Foram selecionados somente os gêneros com AR > 1 %. O gênero destacado em verde corresponde àqueles que AR foi significativamente maior no RALFO e o destacado em laranja àqueles que a AR foi significativamente maior no RALFE. Para os demais gêneros (destacados em preto – Tabela 31) não houve diferença significativa na AR das amostras analisadas.....	167

Figura 66 - Abundância relativa de arqueias metanogênicas encontrados nas amostras de inóculo, e nos reatores alimentados com esgoto lab-made e com esgoto doméstico.....	168
Figura 67 - Comparação entre as amostras do RALFE alimentado com esgoto lab-made e esgoto doméstico para os gêneros dos domínios Bacteria e Archaea. Foram selecionados somente os gêneros com AR > 1 %. Os gêneros destacados em verde correspondem àqueles que AR foi significativamente maior no RALFE tratando esgoto lab-made e os destacados em laranja àqueles que a AR foi significativamente maior no RALFE tratando esgoto doméstico. Para os demais gêneros (letras A até O – Tabela 31) não houve diferença significativa na AR das amostras analisadas.....	170
Figura 68 - Morfologias encontradas na microscopia de fluorescência e contraste de fase para a biomassa do RALFE alimentado com esgoto lab-made (Fase VI). Organismos semelhantes a <i>Methanosaeta</i> com vacúolo (a); <i>Methanosaeta</i> (b); bacilos (c); bacilos delgados (d); cocos (e); cocobacilos (f); esporos ou células em processo de esporulação (g); vibrios (h); bacilos coloniais (i); cocobacilos coloniais (j); diplococo (k); espiroqueta (l); protozoário flagelado (m); cocos fluorescentes (n); bacilos fluorescentes (o); arranjos de células fluorescentes (p).	172
Figura 69 - Morfologias encontradas na microscopia de fluorescência e contraste de fase para a biomassa do RALFE alimentado com esgoto doméstico (Fase VII). Organismos semelhantes a <i>Methanosaeta</i> com vacúolo (a); <i>Methanosaeta</i> (b); bacilos (c); bacilos delgados (d); cocos (e); cocobacilos (f); esporos ou células em processo de esporulação (g); vibrios (h); bacilos coloniais (i); cocobacilos coloniais (j); espiroqueta (l); cocos fluorescentes (n); bacilos fluorescentes (o); arranjos de células fluorescentes (p).	173
Figura 70 - Morfologias encontradas na microscopia de fluorescência e contraste de fase para a biomassa do RALFO alimentado com esgoto doméstico (Fase VII). Organismos semelhantes a <i>Methanosaeta</i> com vacúolo (a); <i>Methanosaeta</i> (b); bacilos (c); bacilos delgados (d); cocos (e); cocobacilos (f); esporos ou células em processo de esporulação (g); vibrios (h); bacilos coloniais (i); espiroqueta (l); cocos fluorescentes (n); bacilos fluorescentes (o); arranjos de células fluorescentes (p).	174
Figura 71 - Cromatograma (íon extraído) dos intermediários <i>m/z</i> 254, 256 e 270 obtidos a partir de análises realizadas por LC–QTOF (ESI (+) MS). Biodegradação do sulfametoxazol após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio.....	178

Figura 72 - Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC–QqToF (ESI (+) MS/MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura dos intermediários de m/z 254 (a), m/z 256 (b) e m/z 270 (c).....	179
Figura 73 - Cromatograma (íon extraído) dos intermediários m/z 276, 161 e 316 obtidos a partir de análises realizadas por LC–QTOF (ESI (+) MS). Biodegradação de CIP após 24, 48 e 72 horas de exposição ao reator anaeróbio	181
Figura 74 - Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC–QqToF (ESI (+) MS/MS) após 24, 48 e 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura dos intermediários de m/z 276 (a), m/z 161 (b) e m/z 316 (c).....	182
Figura 75 - Produtos de degradação (PD) de SMX identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 256 (a e b), m/z 270 (c e d) e m/z 254 (e e f). C/C_0 corresponde a razão de concentração de SMX com relação a concentração inicial. $A/A_{máx}$ corresponde a razão de área dos cromatogramas dos PD apresentados na Figura B1 referente a área máxima obtida.	184
Figura 76 - Produtos de degradação (PD) de CIP identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 161 (a e b), m/z 276 (c e d) e m/z 316 (e e f). C/C_0 corresponde a razão de concentração de CIP com relação a concentração inicial. $A/A_{máx}$ corresponde a razão de área dos cromatogramas dos PD apresentados na Figura B3 referente a área máxima obtida.	185
Figura 77 - Distribuição relativa em termos de área cromatográfica máxima para os produtos de degradação (PD) de SMX e CIP no RALFE operado com esgoto lab-made (Fase VI - TDH = 4 h) e esgoto doméstico (Fase VII - TDH = 12 h).	188
Figura 78 - Ensaio agudo para determinação da LC50 de SMX sobre os organismos <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i>	189
Figura 79 - Ensaio do potencial ecotoxicológico agudo (96 h) das amostras afluente e efluente do RALFE sobre os organismos <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i>	190
Figura 80 - Massa ovígera de <i>Chironomus sancticaroli</i> , observada com estereomicroscópio, utilizada no ensaio crônico – recém-formada (a); após 24 h (b); em processo de eclosão das larvas, aproximadamente 26 h (c).....	191
Figura 81 - Avaliação da sobrevivência e emergência de adultos durante o ensaio crônico das amostras efluente do RALFE sobre <i>Chironomus sancticaroli</i>	192

Figura 82 - Larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> observadas com estereomicroscópio após 10 dias de ensaio crônico – diferenças entre organismos vivos (a) e não-vivos (b)	192
Figura 83 - Imagens do ensaio crônico com <i>Chironomus sancticaroli</i> ao final de 17 dias – organismos adultos (a – fêmea, b – macho), detalhe das asas dos insetos adultos (c e d), estágio de pupa (e), exoesqueleto da pupa que emergiu adulto (f), adulto na parede do frasco (g), e desova resultante ao final do ensaio (h)	194
Figura 84 - Teste de macrodiluição em tubos da atividade antimicrobiana de SMX e CIP sobre <i>E. coli</i> durante 24 h de ensaio	195
Figura 85 - Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana de SMX e CIP em substrato TORRES (1992) sobre <i>Ochrobactrum sp.</i> (a), <i>Brevundimonas sp.</i> (b), <i>Sphingomonas sp.</i> (c) e <i>Escherichia coli</i> (d)	196
Figura 86 - Tubos após 190 h de incubação. M = substrato Torres (1992) (amostra zero); B = Amostra em Branco somente com o substrato e a cultura mãe, sem antibiótico; C1 = 400 ng L ⁻¹ ; C2 = 200 µg L ⁻¹ ; C3 = 5 mg L ⁻¹ ; e C4 = 10 mg L ⁻¹	197
Figura 87 - Presença de halos de inibição no ensaio de atividade antimicrobiana em placas para os gêneros <i>E. Coli</i> e <i>Ochrobactrum sp.</i> para a concentração de 5 mgCIP L ⁻¹ presente no efluente do reator anaeróbio	198
Figura 88 - Performance de acidificação do reator durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). As colunas azuis correspondem aos períodos em que foram feitas as amostragens para análise dos MPOs. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	199
Figura 89 - Perfil temporal de AGV gerados no efluente (em termos de DQO equivalente) durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	200
Figura 90 - Balanço de massa de DQO e composição média de AGV (em termos de DQO equivalente) no reator acidogênico durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	201
Figura 91 - Coeficiente de partição (logK _D) na biomassa hidrolítica / acidogênica e eliminação de MPOs por sorção (%). Valores da literatura apresentados na Tabela 36. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	203

Figura 92 - Correlação entre os valores de biotransformação durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). Os valores detalhados são apresentados na Tabela 37. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	204
Figura 93 - Comparação entre a biotransformação para a fase hidrolítica / acidogênica com a faixa de valores de remoção de MPOs em sistemas anaeróbios apresentada na literatura (detalhes nas Tabelas 4 e 5). n corresponde ao número de valores encontrados para cada MPO. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico.....	207
Figura 94 - Efeito do pH sobre a eliminação dos antibióticos macrolídeos ERY e ROX nos ensaios biótico e abiótico. CBZ foi utilizada como controle negativo. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico.....	209
Figura 95 - Distribuição em massa da eliminação de MPOs durante a fase hidrolítica / acidogênica em termos de biotransformação, sorção, remoção abiótica e fração remanescente no efluente. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	210
Figura 96 - Quantificação em microplaca de 96 poços do teor de proteínas das amostras sobrenadante e lisado celular usadas na determinação da atividade enzimática do reator.	211
Figura 97 - Curva obtida para medição da atividade enzimática da hexoquinase no lisado celular. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	212
Figura 98 - Resultados do ensaio <i>in vitro</i> com a enzima hexoquinase para verificação da biotransformação enzimática de MPOs. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	212
Figura 99 - Degradação da glicose ao longo do ensaio <i>in vitro</i> com a enzima hexoquinase (HK). Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	213

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Faixas de concentrações e eficiências de remoção apresentadas na literatura acerca da ocorrência de sulfametoxazol em esgoto sanitário e efluente dos sistemas de tratamento biológico.....	54
Tabela 2 - Faixas de concentrações e eficiências de remoção apresentadas na literatura acerca da ocorrência de ciprofloxacina em esgoto sanitário e efluente dos sistemas de tratamento biológico.....	58
Tabela 3 - Pesquisas utilizando EPU como material suporte para imobilização da biomassa em reatores de leito fixo.....	61
Tabela 4 - Eficiências de remoção de MPOs encontradas na literatura em sistemas anaeróbios. A descrição dos sistemas e as condições operacionais são detalhadas na Tabela 5.....	69
Tabela 5 - Condições operacionais e tipo de tratamento anaeróbio empregado em cada estudo referente à Tabela 4.....	70
Tabela 6 - Parâmetros Ecotoxicológicos avaliados em diferentes organismos-teste expostos a SMX e CIP	78
Tabela 7 - Características físicas e operacionais dos reatores anaeróbios de leito fixo em fluxo ascendente - empacotado (RALFE) e ordenado (RALFO); e da EPU empregada no leito fixo	83
Tabela 8 - Composição do substrato lab-made.....	87
Tabela 9 - Análises físico-químicas realizadas na pesquisa.....	88
Tabela 10 – Transições de massas monitoradas por espectrometria para os antibióticos SMX e CIP, e seus padrões internos.....	91
Tabela 11 - Valores de L/D e representação do TDH em cada ponto de amostragem nos reatores, considerando o escoamento como pistonado.	98
Tabela 12 - Aplicações, fórmula e estrutura molecular dos micropoluentes orgânicos monitorados na operação do reator hidrolítico / acidogênico	114
Tabela 13 - Resultados do ensaio hidrodinâmico e parâmetros do modelo de dispersão longitudinal nos reatores	126
Tabela 14 - Resultados de DQO, SMX, CIP e eficiência de remoção nos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão	131

Tabela 15 - Resultados de fração molar, vazão molar, produção volumétrica e rendimento de metano nos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão.....	133
Tabela 16 - Valores específicos (* - em termos de SSV) de produção volumétrica, vazão molar e rendimento de metano nos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão.....	135
Tabela 17 - Parâmetros do modelo cinético de primeira ordem estimado para remoção de DQO, SMX e CIP para as Fases de I a IV. Concentrações C_0 e C_r em mg L^{-1} para DQO e ng L^{-1} para SMX / CIP; k^{app} em h^{-1} ; e k^{app*} em $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{SSV}$	137
Tabela 18 - Compilação dos resultados dos parâmetros operacionais dos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão	139
Tabela 19 - Cálculo do TDH mínimo aplicável a partir dos resultados do ensaio hidrodinâmico e dos parâmetros do modelo de dispersão longitudinal dos reatores.....	140
Tabela 20 - Valores de DQO, SMX, CIP, eficiência de remoção, COV e velocidade ascensional nos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão.	144
Tabela 21 - Resultados de fração molar, vazão, produção volumétrica e rendimento de metano nos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão	149
Tabela 22 - Valores específicos (* - em termos de SSV) de produção volumétrica, vazão molar e rendimento de metano nos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão.....	151
Tabela 23 - Parâmetros do modelo cinético de primeira ordem estimado para remoção de DQO, SMX e CIP para as Fases de IV a VII. Concentrações C_0 e C_r em mg L^{-1} para DQO e ng L^{-1} para SMX / CIP; k^{app} em h^{-1} ; e k^{app*} em $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{SSV}$	153
Tabela 24 - Compilação dos resultados dos parâmetros operacionais dos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão	155
Tabela 25 - Conteúdo de biomassa presente ao longo do perfil espacial dos reatores RALFE e RALFO	156
Tabela 26 - Cálculo dos parâmetros relacionados a produção e arraste de biomassa, e à utilização de substrato (em termos de DQO) pela biomassa nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a VII.....	158

Tabela 27 - Valores de CIP detectados nas amostras de biomassa do leite fixo dos reatores e valores de $\log K_D$ estimados para cada amostra.....	160
Tabela 28 - Concentração efluente de CIP relacionada a sorção (C_{sor}) e contribuição da sorção na eliminação total da CIP do sistema	162
Tabela 29 - Valores da constante de biotransformação k_{bio} ($L.g^{-1}SSV.d^{-1}$) de SMX e CIP para as Fases de II a VII.....	162
Tabela 30 - Índices de riqueza, dominância e diversidade de espécies para as amostras de inóculo, e reatores alimentados com esgoto lab-made e com esgoto doméstico	164
Tabela 31 - Gêneros dos domínios Bacteria e Archaea apontados nas Figuras 65 e 67	168
Tabela 32 - Produtos de degradação identificados por LC-QTOF (ESI (+) MS) para SMX e CIP nos ensaios em batelada	178
Tabela 33 - Estruturas moleculares propostas para os produtos de degradação de SMX, com sua transição de massa mais intensa, monitorados ao longo do perfil espacial do RALFE..	186
Tabela 34 - Estruturas moleculares propostas para os produtos de degradação de CIP, com sua transição de massa mais intensa, monitoradas ao longo do perfil espacial do RALFE..	187
Tabela 35 - Compilação dos resultados e parâmetros de desempenho operacional do reator hidrolítico / acidogênico para ambas as fases de operação. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	202
Tabela 36 - Valores de $\log K_D$ indicados na literatura em condições anaeróbias.	203
Tabela 37 - Resultados de biotransformação e sorção (média $\pm$ desvio padrão) de MPOs durante cada etapa (fermentação do amido e da glicose) e durante toda a operação. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	205
Tabela 38 - Valores de k_{bio} ($L.g^{-1}SSV.d^{-1}$) calculados para cada MPO e comparação com os resultados prévios obtidos em reator UASB. Valores destacados em verde, amarelo e vermelho indicam alta ($k_{bio} \geq 0,1$), média ($0,04 < k_{bio} < 0,1$) e baixa BT ($k_{bio} \leq 0,04$), respectivamente. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	206
Tabela 39 - Valores de atividade enzimática presente no reator hidrolítico / acidogênico referente às enzimas alfa-amilase e glucoamilase. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico	211

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Afluyente
AB	Antibiótico (s)
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ADBI	Celestolide
AE	Afluyente RALFE
Afl.	Afluyente
AGV	Ácidos graxos voláteis
AHTN	Tonalide
AI	Alcalinidade intermediária
AnMBR	Anaerobic membrane bioreactor
ANOVA	Análise de Variância
AO	Afluyente RALFO
AP	Alcalinidade parcial
APHA	American Public Health Association
AR	Abundância relativa
AS	Arraste de sólidos
ATP	Adenosina trifosfato
AVT	Ácidos voláteis totais
BCA	Bicinchoninic acid
BES	2-Bromoetanosulfonado
BPA	Bisfenol-A
BT	Biotransformação
C	Controle
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBZ	Carbamazepina
CE50	Concentração efetiva média
CENO	Concentração de efeito não observado.
C–F	Ligação carbono - flúor
CIP	Ciprofloxacina
CIP-D ₈	Padrão Interno – ciprofloxacina dealterada

CL50	Concentração letal média
CNP	2-cloro-4-nitrofenol
CNPG ₂	2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltoside
CNPG ₃	2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriósido
COV	Carga orgânica volumétrica
CPS	Cycles per second
CROMA	Laboratório de Cromatografia
CSTR	Continuous stirred-tank reactor
CTL	Citalopram
D/uL	Número de dispersão
DCF	Diclofenaco
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DZP	Diazepam
E	Efluente RALFE ou Leito empacotado
E. coli	Escherichia coli
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
EDGs	Electron donating groups
EE2	17 α -etinilestradiol
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
Efl.	Efluente
ERY	Eritromicina
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de esgoto
EWGs	Electron withdrawing groups
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FID	Flame ionization detector
FLX	Fluoxetina
G	Glicose
G3	Maltotriose
GC	Gas chromatography

HHCB	Galaxolide
HK	Hexoquinase
HLB	Hydrophilic lipophilic balanced
IBP	Ibuprofeno
Intens.	Intensidade
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
L	Comprimento
LAS	Linear alquilbenzeno sulfonado
LB	Luria-bertani
LC	Liquid chromatography
LD	Limite de detecção
LEAA	Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos
LED	Light emitting diode
LOEC	Lowest-observed-effect concentration
log	Logaritmo
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
<i>m/z</i>	<i>Massa/carga</i>
máx.	Máximo (a)
MeOH	Metanol
MPOs	Micropoluentes orgânicos
MS	Mass spectrometry
MTBE	Methyl tert-butyl ethretensãoer
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Forma reduzida de NAD
NE	Não especificado
NOR	Norfloxacin
NP	Nonilfenol
NPX	Naproxeno
NT	Nitrogênio total
O	Efluente RALFO
OP	Octilfenol
OTUs	Operational taxonomic unit
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
PD	Produtos da degradação
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PS	Produção de sólidos
PSF	Produtos solúveis da fermentação
PVC	Policloreto de vinila
PV _{CH₄}	Produção volumétrica de metano
PV _{CH₄} *	Produção volumétrica de metano específica
Q	Vazão
R	Radical orgânico
RAHLF	Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
RALFE	Reator Anaeróbio de Leito Fixo Empacotado
RALFO	Reator Anaeróbio de Leito Fixo Ordenado
Ref.	Referência
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _r	RNA ribossômico
ROX	Roxitromicina
SDT	Sólidos dissolvidos totais
SMX	Sulfametoxazol
SMZ	Sulfametazina
SPE	Solid phase extraction
SRM	Selected reaction monitoring
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
TCD	Thermal conductivity detector
TCS	Triclosan
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TE	Tris-EDTA
TMP	Trimetoprim
ToF	Time of flight

T _R	Tempo de retenção
TRC	Tempo de Retenção Celular
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UF	Ultrafiltração
USA	United States of América
USE	Ultrasonic solvent extraction
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
¹³ C ₆ -SMX	Padrão Interno - sulfametoxazol

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área
$A_{\text{máx}}$	Área máxima
atm	Atmosferas
C	Concentração
C_0	Concentração inicial
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio diidratado
CaCO_3	Carbonato de cálcio
CH_4	Metano
C_{liq}	Concentração na fase aquosa
cm	Centímetro
CO_2	Gás carbônico
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cobalto hexaidratado
C_R	Concentração residual
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cobre diidratado
C_x	Concentração na fase sólida
D	Dominância ou coeficiente de dispersão longitudinal
d	Dia (s)
eV	Eletron volt (s)
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de ferro (II) tetraidratado
G	Força centrífuga relativa
g	Gramas (s)
H	Constante da Lei de Henry ou índice de diversidade de Shannon
h	Hora (s)
H_2	Gás hidrogênio
H_2S	Gás sulfídrico
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
k_1	Constante cinética de primeira ordem
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Dicromato de potássio
k^{app}	Constante cinética aparente
$k^{\text{app}*}$	Constante cinética aparente específica

k_{bio}	Constante de biodegradação
KCl	Cloreto de potássio
K_d	Coeficiente de distribuição sólido-água
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma (s)
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
KHCO_3	Bicarbonato de potássio
K_{ow}	Coeficiente de distribuição octanol-água
kV	Quilovolt (s)
L	Litro
m	Metro (s)
M	Molar
m^2	Metro quadrado
m^3	Metro cúbico
mg	Miligrama (s)
Mg^{2+}	Íon magnésio
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de magnésio hexaidratado
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mmol	Milimol
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de manganês tetraidratado
ms	Milisegundos
N_2	Gás nitrogênio
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sódio diidratado
Na_2SeO_3	Seneleto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NaN_3	Azida sódica
NaOH	Soda cáustica
n_{CH_4}	Número de mols de metano
ng	Nanograma (s)
NH_4Cl	Cloreto de amônio

NH_4OH	Hidróxido de amônio
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de níquel hexaidratado
nm	Nanômetro
O_2	Gás oxigênio
OH^-	Íon hidroxila
pg	Picograma (s)
pKa	Logaritmo do inverso da constante de acidez
Q	Vazão
r^2	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
SO_4	Sulfato
T	Temperatura
t	Tempo
U	Unidade enzimática
u	Velocidade
V	Volts
v/v	Relação volume / volume
V_i	Volume injetado
V_u	Volume útil
W	Watt
x	Eixo x
X_{CH_4}	Fração molar de CH_4
X_{CO_2}	Fração molar de CO_2
X_{ss}	Concentração de sólidos suspensos
y	Eixo y
Y_{biomassa}	Coefficiente de produção celular
Y_{H_2}	Rendimento de hidrogênio
ZnCl_2	Cloreto de zinco
α	Nível de Significância
η_{CH_4}	Rendimento de metano
$\eta_{\text{CH}_4^*}$	Rendimento de metano específico
θ_h	TDH
v_{CH_4}	Vazão molar de metano

$v_{CH_4^*}$	Vazão molar de metano específica
σ^2	Variância
σ_{Θ}^2	Variância adimensional
%	Por cento
[M+H]	Modo de ionização positivo
<	Menor que
>	Maior que
$\pm$	Mais ou menos
$\leq$	Menor ou igual que
$\geq$	Maior ou igual que
$^{\circ}\text{C}$	Graus célsius
μg	Micrograma (s)
μL	Microlitro (s)
μm	Micrômetro (s)
μmol	Micromol (s)
μS	Microsiemens
∞	Infinito

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	43
2. OBJETIVOS.....	47
2.1. Objetivo geral.....	47
2.2. Objetivos específicos	47
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	49
3.1. Antibióticos no ambiente e seus potenciais efeitos.....	49
3.2. As sulfonamidas e o sulfametoxazol como antibiótico de interesse	51
3.3. As fluoroquinolonas e a ciprofloxacina como antibiótico de interesse.....	55
3.4. Tratamento biológico em reatores anaeróbios de leito fixo para remoção de antibióticos	59
3.5. Mecanismos envolvidos na remoção de antibióticos	61
3.5.1. <i>Sorção</i>	62
3.5.2. <i>Biodegradação</i>	63
3.5.3. <i>Degradação abiótica e volatilização</i>	65
3.6. Influência das etapas da digestão anaeróbia sobre a remoção de micropoluentes orgânicos.....	66
3.7. Produtos gerados pela degradação biológica de antibióticos	71
3.8. Efeitos ecotoxicológicos dos antibióticos	76
3.9. Considerações Finais	79
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.1. Estratégia experimental.....	81
4.2. Configuração dos reatores e do material suporte	82
4.3. Biomassa de inóculo e procedimento de partida.....	85
4.4. Preparo e composição do esgoto lab-made	86
4.5. Métodos analíticos e monitoramento do desempenho dos reatores	87
4.5.1. <i>Determinação de SMX e CIP</i>	89
4.5.2. <i>Análises microbiológicas dos reatores</i>	94
4.6. Comportamento hidrodinâmico dos reatores	95
4.7. Perfis espaciais de DQO e antibióticos para estimativa de modelos e parâmetros cinéticos.....	97
4.8. Avaliação do conteúdo e perfis espaciais de biomassa nos reatores.....	98

4.9. Ensaio de sorção	100
4.10. Estudo dos possíveis produtos de degradação formados.....	102
4.11. Ensaio ecotoxicológico	105
4.12. Ensaio de atividade antimicrobiana	108
4.13. Avaliação da influência da hidrólise e acidogênese na remoção de micropoluentes orgânicos.....	111
4.13.1. Reator hidrolítico / acidogênico e condições operacionais.....	111
4.13.2. Micropoluentes orgânicos (MPOs) selecionados para o estudo	113
4.13.3. Métodos analíticos	115
4.13.4. Balanço de massa de DQO e desempenho de acidificação do reator.....	117
4.13.5. Balanço de massa de MPOs, parâmetros de sorção e biotransformação.....	118
4.13.6. Influência do pH na eliminação de MPOs	120
4.13.7. Influência da atividade enzimática na eliminação de MPOs.....	121
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
5.1. Ensaio hidrodinâmico dos reatores	125
5.2. Avaliação do desempenho dos reatores em TDH de 12 h.....	126
5.2.1. Remoção de DQO, SMX e CIP.....	126
5.2.2. Produção e rendimento de metano.....	132
5.2.3. Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP	135
5.2.4. Demais parâmetros operacionais e resultados médios obtidos	138
5.3. Otimização do TDH por meio dos perfis cinéticos e hidrodinâmicos.....	139
5.4. Avaliação da influência do TDH e do substrato sobre o desempenho dos reatores	140
5.4.1. Remoção de DQO, SMX e CIP.....	141
5.4.2. Produção e rendimento de metano.....	147
5.4.3. Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP	151
5.4.4. Demais parâmetros operacionais e resultados médios obtidos	154
5.5. Avaliação do conteúdo de biomassa nos reatores	156
5.6. Avaliação do mecanismo de sorção sobre a eliminação de SMX e CIP	159
5.7. Avaliação da constante de biotransformação - k_{bio}	162
5.8. Análise microbiológica dos reatores	163

5.9. Identificação dos produtos de degradação de SMX e CIP	177
5.10. Ensaios ecotoxicológicos	188
5.10.1. <i>Determinação da LC50</i>	188
5.10.2. <i>Ensaios Agudos</i>	189
5.10.3. <i>Ensaios Crônicos</i>	191
5.11. Ensaios de atividade antimicrobiana.....	195
5.12. Avaliação da influência da etapa hidrolítica / acidogênica sobre a remoção de MPOs.....	198
5.12.1. <i>Performance do reator hidrolítico / acidogênico</i>	199
5.12.2. <i>Biotransformação, sorção e remoção abiótica dos MPOs</i>	202
5.12.3. <i>Influência da atividade enzimática sobre a biotransformação dos MPOs</i>	210
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	215
7. SUGESTÕES E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	217
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DO TRABALHO	219
REFERÊNCIAS	223
APÊNDICES	241

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de compostos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas e aditivos alimentares, entre outros, trouxe muitos benefícios para os seres humanos. No entanto, um aspecto que deve ser considerado é que após o seu uso, ou mesmo nas etapas associadas à sua produção, esses acabam atingindo o ambiente, seja na forma de resíduos sólidos, efluentes líquidos, emissões gasosas e, até mesmo, pelo lançamento acidental ou indiscriminado. Diante desse cenário, surgem os contaminantes emergentes que estão presentes em diversas matrizes ambientais em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou até inferiores (ng L^{-1} ou pg L^{-1}), podendo causar efeitos negativos à saúde humana, animal e aos ecossistemas aquáticos.

Os antibióticos estão entre os fármacos mais encontrados nos ambientes aquáticos em todo o mundo, sendo apenas parcialmente degradados em estações de tratamento biológico. Estudos acerca de antibióticos têm especial significância, uma vez que eles apresentam largo uso na medicina humana e veterinária, o que resulta em diversas fontes potenciais de contaminação, como as estações de tratamento de efluentes domésticos e os locais de criação extensiva de animais; além da capacidade de alterar a estrutura da comunidade microbiana, promovendo o desenvolvimento de genes de resistência em microrganismos patogênicos. Assim, o lançamento de antibióticos no ambiente pode constituir uma séria ameaça para a saúde pública, à medida que as infecções não podem mais ser tratadas com os antimicrobianos conhecidos atualmente.

O sulfametoxazol (da classe das sulfonamidas) e a ciprofloxacina (da classe das fluoroquinolonas) são dois antibióticos largamente utilizados na medicina humana e veterinária, e estão entre os mais frequentemente detectados no ambiente aquático, podendo causar efeitos adversos para as comunidades microbianas, impondo, portanto, grande risco para as espécies não-alvo nos ecossistemas.

Algumas possíveis tecnologias disponíveis para a efetiva remoção de fármacos, notadamente os antibióticos, referem-se a sistemas físico-químicos como adsorção em carvão ativado, fotocatalise, ozonização e aplicação de luz ultravioleta. No entanto, esses processos demandam altos custos de investimento e apresentam operação mais sofisticada. Assim, é de suma importância conhecer o comportamento e otimizar os mecanismos de remoção desses fármacos nos sistemas biológicos de tratamento.

Nesse aspecto, a remoção em sistemas de lodos ativados e biorreatores aeróbios com membranas, são as mais estudadas, uma vez que são as configurações mais usadas nos países

desenvolvidos. Em contrapartida, estudos de remoção e biodegradação de fármacos em sistemas anaeróbios se mostra incipiente. Esses sistemas são largamente utilizados ao redor do mundo de variadas formas, por exemplo como unidade de tratamento secundário em países tropicais, na digestão de lodos primários e secundários de plantas de lodos ativados, e como unidade preliminar de sistemas que demandam a remoção biológica de fósforo. Faz-se necessário, portanto, avaliar o desempenho dos sistemas anaeróbios na remoção de fármacos, bem como os mecanismos envolvidos na eliminação desses compostos do meio, de forma a otimizar sua biodegradação.

A aplicação de reatores de leito fixo no tratamento anaeróbio de águas residuárias domésticas e industriais tem aumentado nos últimos anos, com a utilização de diferentes tipos de materiais suporte. Os reatores de leito empacotado possuem a conformação do leito tradicionalmente empregada nesses reatores. No entanto, esta configuração pode apresentar alguns problemas operacionais tais como a diminuição do tempo de detenção hidráulica, devido a problemas de colmatação do leito; presença de caminhos preferenciais; e maior resistência à transferência gasosa para o headspace. O reator de leito ordenado surge, portanto, como alternativa de forma a evitar esses potenciais problemas hidrodinâmicos observados com o leito empacotado. A espuma de poliuretano tem sido amplamente estudada para diversas aplicações como material suporte para imobilização de biomassa sobretudo devido a sua elevada porosidade, baixo custo e fácil aquisição.

Diante da hipótese de que a formação de biofilme em reatores com biomassa aderida pode promover a adaptação da comunidade microbiana a compostos xenobióticos do meio, facilitando sua biodegradação, este estudo buscou avaliar a aplicabilidade de reatores de leito fixo na remoção dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina, frequentemente detectados no esgoto sanitário. Além disso, outra hipótese levantada é de que a conformação do leito dos reatores poderia implicar em diferenças na performance dos mesmos na remoção dos fármacos. Assim, nesta pesquisa avaliou-se comparativamente o desempenho de duas configurações de biorreatores anaeróbios de leito fixo – ordenado e empacotado, no tratamento de águas residuárias domésticas contendo os antibióticos supracitados. De maneira mais ampla, pretende-se com este estudo estabelecer um sistema de tratamento que pode constituir numa barreira primária na dispersão desses micropoluentes no ambiente, contribuindo para a redução dos impactos à biota e à saúde humana, além do não desenvolvimento de genes de resistência nos organismos-alvo.

A estrutura da tese está dividida em oito capítulos. O capítulo 2 aborda o objetivo principal que se pretende atingir com essa pesquisa, baseando-se nas hipóteses levantadas

anteriormente, bem como os objetivos específicos propostos neste estudo. No capítulo 3, são apresentados aspectos teóricos e relevantes que embasam o tema da pesquisa e justificam os objetivos que se pretende alcançar neste trabalho, tais como: a problemática da presença dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina no esgoto sanitário, e suas rotas de contaminação no ambiente, considerando também os potenciais efeitos ecotoxicológicos e produtos de degradação formados; as vantagens do tratamento biológico em reatores de biomassa imobilizada na degradação de micropoluentes; os possíveis mecanismos de remoção envolvidos na degradação dos antibióticos; e a influência das diferentes etapas da digestão anaeróbia sobre a biodegradação dos micropoluentes orgânicos.

O capítulo 4 apresenta as metodologias e estratégias experimentais empregadas, de forma a atender os objetivos propostos na pesquisa. No capítulo 5, são apresentados e discutidos os resultados obtidos, no que tange principalmente aos aspectos operacionais e desempenho dos reatores na remoção dos antibióticos, bem como os mecanismos e microrganismos envolvidos nessa remoção e potenciais impactos ecotoxicológicos e de atividade antimicrobiana do efluente gerado nos biorreatores.

No capítulo 6, são elencados as principais conclusões e considerações finais dessa pesquisa, a partir dos resultados obtidos e de forma a verificar se os objetivos propostos foram alcançados. São apresentados também sugestões e perspectivas para trabalhos futuros (Capítulo 7), a fim de aprofundar na temática deste estudo e preencher lacunas de conhecimento; e a produção científica resultante da tese até o presente momento (Capítulo 8). Finalmente, são elencadas todas as referências bibliográficas consultadas e citadas ao longo do texto, e os apêndices que complementam alguns pontos específicos do texto principal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar comparativamente a remoção dos antibióticos sulfametoxazol (SMX) e ciprofloxacina (CIP), presentes no esgoto doméstico, em duas configurações de reatores anaeróbios de leito fixo – ordenado e empacotado – utilizando espuma de poliuretano como material suporte.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos da pesquisa foram:

- Avaliar a cinética de degradação dos antimicrobianos testados;
- Avaliar os mecanismos de remoção desses compostos, como sorção e biodegradação;
- Avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica sobre o desempenho dos reatores na remoção de SMX e CIP;
- Avaliar a influência de SMX e CIP sobre a digestão da matéria orgânica e produção de metano nos reatores;
- Avaliar comparativamente a degradação de SMX e CIP em esgoto lab-made e doméstico;
- Identificar os produtos de degradação formados nos reatores e suas possíveis rotas metabólicas;
- Avaliar a comunidade microbiana presente nos reatores, bem como estabelecer possíveis associações com a degradação dos fármacos;
- Avaliar o impacto dos antimicrobianos testados sobre a biota por meio de ensaios ecotoxicológicos e de atividade antimicrobiana;
- Avaliar o efeito das etapas hidrolítica e acidogênica da digestão anaeróbia sobre a remoção de diferentes micropoluentes orgânicos, bem como os mecanismos envolvidos em cada etapa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Antibióticos no ambiente e seus potenciais efeitos

O monitoramento de compostos farmacêuticos e seus metabólitos no ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas no esgoto doméstico, em efluentes de estações de tratamento de esgoto, águas superficiais e subterrâneas, em baixas concentrações – da ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (KUMMERER, 2001; BILA; DEZOTTI, 2003; BOXALL et al., 2012).

Os fármacos são compostos ativos complexos, desenvolvidos e usados com o objetivo de promover efeitos biológicos específicos nos organismos (KÜMMERER, 2009). Tais compostos podem ser administrados oralmente, topicamente (aplicação na pele e mucosas) ou por via parenteral (injeções e infusões). Depois da administração, essas substâncias são absorvidas, distribuídas, parcialmente metabolizadas, e finalmente excretadas do corpo (via fezes e urina) em suas formas originais, conjugadas ou como metabólitos (STUMPF et al., 1999; TAMBOSI, 2008).

Ao contrário de outros micropoluentes, cujas concentrações no ambiente tenderão a diminuir nos próximos anos por meio de restrições legais, é esperada uma ampliação no consumo dos fármacos devido aos seus efeitos benéficos à saúde e, consequentemente, espera-se também um aumento na sua ocorrência no ambiente (VIRKUTYTE; VARMA; JEGATHEESAN, 2010).

Dentre as classes de fármacos mais frequentemente encontradas em ambientes aquáticos, pode-se destacar: os anti-inflamatórios, os antibióticos e os reguladores lipídicos. Os antibióticos são caracterizados por uma grande variedade de substâncias, a exemplo das penicilinas, tetraciclina, sulfonamidas e fluoroquinolonas (SANTOS et al., 2010).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Aplicações na medicina humana e veterinária são as principais fontes de contaminação de antibióticos para o ambiente, sobretudo por meio das excretas e seu subsequente transporte (HEBERER, 2002). Além disso, tem-se observado o uso extensivo e indiscriminado desses antibióticos, o que resulta na introdução contínua desses compostos nas diversas matrizes

ambientais. Na Figura 1 pode-se observar as principais rotas de contaminação de antibióticos e seus metabólitos no ambiente.

Figura 1 - Origem e principais rotas de contaminação de antibióticos de uso humano e veterinário

Fonte: Adaptado de Homem e Santos (2011).

As principais preocupações da presença de antibióticos e seus metabólitos no ambiente residem no fato de que esses podem gerar efeitos genotóxicos na biota aquática, promover o desenvolvimento de genes de resistência, dificultar ações de reúso de água, e até mesmo gerar implicações sobre a saúde humana (DAUGHTON; TERNES, 1999). A indução de resistência em cepas bacterianas causa uma séria ameaça à saúde pública, já que cada vez mais infecções não podem ser tratadas pelos antibióticos conhecidos (HIRSCH et al., 1999; WHO, 2014). Além disso, o custo financeiro de uma terapia fracassada por conta de microrganismos resistentes é muito grande, onerando ainda mais os sistemas públicos de saúde. Bactérias resistentes geram nova consulta, novos exames diagnósticos, nova prescrição, sem contar a provável internação e ocupação de leitos hospitalares (DEL FIOLE et al., 2010). Outra questão relevante e preocupante é que há indícios de que o desenvolvimento de bactérias resistentes seja favorecido por baixas concentrações de antibiótico no ambiente, que é o que ocorre na maioria dos casos (JØRGENSEN; HALLING-SØRENSEN, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que a resistência aos antibióticos tem aumentado e isso representa um imenso perigo para a saúde mundial, com registros de

ocorrências fatais por infecções simples que são tratáveis há décadas. Em contrapartida, as pesquisas de novos antibióticos têm diminuído, em virtude de a indústria farmacêutica priorizar a busca por medicamentos de rápida disponibilidade comercial e mais lucrativos. A OMS estabelece ainda que a comunidade internacional deverá otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos e investir em programas e ações contra a resistência a antibióticos (WECKX, 2012; WHO, 2014).

3.2. As sulfonamidas e o sulfametoxazol como antibiótico de interesse

As sulfonamidas, também conhecidas como sulfas, foram testadas pela primeira vez nos anos 1930 como fármacos antibacterianos. Um exemplo de sulfa ainda utilizado na terapêutica é o sulfametoxazol, em associação com o trimetoprim, para o tratamento de pacientes com infecções no trato urinário e para pacientes portadores do vírus HIV que apresentam infecções por *Pneumocystis carinii*. Cada um desses fármacos bloqueia uma etapa no metabolismo do ácido fólico. As sulfonamidas são, portanto, agentes bacteriostáticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A estrutura química geral das sulfonamidas é apresentada na Figura 2a. A molécula possui caráter anfótero e consiste de um anel de benzeno, um grupamento ácido sulfonamida ($-\text{SO}_2\text{NH}$), conectado a um radical orgânico ($-\text{R}$), e um grupamento básico amina ($-\text{NH}_2$). Os grupos amina e sulfonamida precisam estar conectados ao anel de benzeno na conformação *para*, para que a molécula possua propriedade antibacteriana (QIANG; ADAMS, 2004; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; MAJEWSKY et al., 2014). Na Figura 2b é apresentada a estrutura química do sulfametoxazol (SMX), cuja fórmula molecular é dada por $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (massa molar = $253,3 \text{ g mol}^{-1}$). Na Figura 3 é apresentado o esquema de dissociação da sulfonamida, que apresenta duas constantes de ionização principais, $\text{pK}_{a1} = 1,97$ e $\text{pK}_{a2} = 6,16$ (QIANG; ADAMS, 2004). Portanto, a distribuição das espécies químicas de SMX é dependente do pH do meio, conforme detalhado na Figura 4, sendo que para a faixa de pH usualmente encontrada nos esgotos sanitários e efluentes anaeróbios (6 a 8), a espécie dominante é a aniônica.

Figura 2 - Estrutura química geral das sulfonamidas (a) e do sulfametoxazol (b)

Fonte: ChemSketch v. 11.0.

Figura 3 - Esquema do equilíbrio de dissociação das sulfonamidas

Fonte: Qiang e Adams (2004).

Figura 4 - Distribuição das espécies químicas de SMX de acordo com o pH do meio

Fonte: Adaptado de Chemaxon Database.

Com o desenvolvimento e aprimoramento dos métodos analíticos de detecção de micropoluentes, surgiram várias pesquisas indicando as concentrações de SMX em diferentes compartimentos ambientais, como esgotos domésticos, efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETEs), águas superficiais e subterrâneas. Na Tabela 1 são apontados alguns desses estudos indicando as faixas de concentração encontradas em esgoto sanitário afluentes às ETEs, nos efluentes das estações, bem como as eficiências de remoção atingidas nos sistemas de tratamento em escala real, com enfoque para os processos biológicos. Na Figura 5 encontra-se o gráfico de boxplot referente a esses dados apresentados na literatura.

Tabela 1 - Faixas de concentrações e eficiências de remoção apresentadas na literatura acerca da ocorrência de sulfametoxazol em esgoto sanitário e efluente dos sistemas de tratamento biológico

SMX			Sistema de Tratamento	País	Referência
Afluente (ng L ⁻¹)	Efluente (ng L ⁻¹)	Remoção (%)			
390 - 1000	<LD ⁽¹⁾ - 310	21 - 100	LA ⁽²⁾	México	Brown et al. (2006)
580	250	57	LA	Espanha	Carballa et al. (2004)
450	<LD	100	LA	Coréia	Choi et al. (2007)
24 - 145	51 - 91	-279 - 61	LA	Áustria	Clara et al. (2005)
430	290	33	LA	Suíça	Göbel et al. (2005)
590	390	34	NE ⁽³⁾	Croácia	Gros, Petrović e Barceló (2006)
80 - 1250	<LD - 370	-24 - 100	LA / VO ⁽⁴⁾	USA	Karthikeyan e Meyer (2006)
<LD - 350	<LD - 23	66	LA	Reino Unido	Kasprzyk-Hordern, Dinsdale e Guwy (2009)
179 - 1760	47 - 964	26 - 88	LA	Taiwan	Lin, Yu e Lateef (2009)
20 - 1250	18 - 320	66	LA	França	Miège et al. (2009)
10 - 118	12 - 78	-20 - 64	LA	China	Xu et al. (2007)
246	46	81	LA	Itália	Zuccato et al. (2010)
4 - 850	3 - 781	-146 - 78	LA / FB ⁽⁵⁾ / A2O ⁽⁶⁾ / AO ⁽⁷⁾	China	Zhang et al. (2017)
9 - 959	7 - 107	20 - 89	VO / A2O	China	Wu et al. (2016)
370 - 612	395 - 678	-23 - 29	LA / OD / A2O	China	Du, Fan e Qian (2015)
216 - 543	65 - 106	53 - 84	LA / OD	China	Zhou et al. (2013)
<LD - 150,8	<LD - 160,9 <LD - 123,3 <LD - 49,4 <LD - 124 <LD - 56,8	22 -20 53 22 71	UASB ⁽⁸⁾ - TDH ⁽⁹⁾ 5,4 h UASB - TDH 8,7 h UASB - TDH 11 h UASB / FB - Polietileno UASB / FB - EPU ⁽¹⁰⁾	Brasil	Brandt et al. (2013)
39 - 293	8 - 155	-7 - 79	LA	China	Leung et al. (2012)
290 - 1000	130 - 460	-5 - 62	LA / OD / A2O / AO	China	Gao et al. (2016)
<LD - 939	<LD - 3234	-170 - 100	LA	Índia	Prabhasankar et al. (2016)

¹ Limite de detecção; ² Lodos Ativados; ³ Não Especificado; ⁴ Valo de oxidação; ⁵ Filtro Biológico;

⁶ Anaeróbio / Anóxico / Aeróbio; ⁷ Anóxico / Aeróbio; ⁸ Upflow Anaerobic Sludge Blanket; ⁹

Tempo de Detenção Hidráulico; ¹⁰ Espuma de Poliuretano.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Boxplot da concentração afluenta (Afl.), efluente (Efl.) e eficiência de remoção de SMX nas estações de tratamento de esgoto referente aos dados apresentados na Tabela 1

Fonte: Autoria própria.

Observa-se, pelos dados apresentados, uma grande variabilidade da ocorrência de SMX no esgoto sanitário bruto e tratado, o que possivelmente pode ser explicado pelo padrão de consumo diferenciado do antibiótico. Países e regiões diferem em todo o mundo na prevalência de doenças, nos processos de tratamento de esgoto, nos hábitos culturais ou até nas restrições econômicas relacionadas com o mercado farmacêutico (ZUCCATO et al., 2006). As eficiências de remoção indicadas também apresentaram grande variabilidade, sendo encontrados desde valores negativos até remoção completa, não sendo verificado, portanto, um padrão de eliminação nos sistemas de tratamento biológico usuais, notadamente, no processo de lodos ativados, largamente aplicado ao redor do mundo.

3.3. As fluoroquinolonas e a ciprofloxacina como antibiótico de interesse

As quinolonas e fluoroquinolonas são fármacos bactericidas muito utilizados no tratamento de infecções do trato urinário e no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos agentes antibacterianos mais usuais. O ácido nalidíxico, sintetizado em 1962, foi o protótipo desta classe de antibióticos. Vários outros análogos têm sido sintetizados, com propriedades similares ao ácido nalidíxico. A ciprofloxacina é o antibiótico mais ativo da classe das fluoroquinolonas frente a bactérias gram negativas. Esse

fármaco é amplamente utilizado em infecções do trato urinário, respiratório e gastrointestinal, além de infecções de pele, ossos e articulações (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A estrutura química geral das quinolonas é apresentada na Figura 6a. A molécula contém dois anéis fundidos, ligados a um grupo carboxílico e um grupo cetona. Quando o radical R4 é o flúor, a quinolona recebe o nome de fluoroquinolona. Na Figura 6b observa-se a estrutura química da ciprofloxacina (CIP), cuja fórmula molecular é dada por $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ (massa molar = $331,3 \text{ g mol}^{-1}$). Na Figura 7 é apresentado o esquema de protonação e desprotonação para fluoroquinolona, que apresenta duas constantes de ionização principais, $pK_{a1} = 5,6$ e $pK_{a2} = 8,8$. A presença do grupo carboxílico e os três grupamentos básicos nitrogenados confere a ciprofloxacina alto grau de especiação, conforme detalhado na Figura 8. Para a faixa de pH usualmente encontrada nos esgotos sanitários e efluentes anaeróbios (6 a 8), a espécie dominante possui caráter anfótero. A especiação dos antibióticos na água pode impactar significativamente os processos ambientais relacionados a remoção destes compostos tais como sorção no solo, complexação com metais, fotodecomposição e biodegradação (QIANG; ADAMS, 2004; KÜMMERER, 2009).

Figura 6 - Estrutura química geral das quinolonas (a) e da ciprofloxacina (b)

Fonte: ChemSketch v. 11.0.

Figura 7 - Esquema de protonação e desprotonação para fluoroquinolonas

Fonte: Adaptado de Mitscher (2005).

Figura 8 - Distribuição das espécies químicas de CIP de acordo com o pH do meio

Fonte: Adaptado de Chemaxon Database.

A ciprofloxacina, assim como o sulfametoxazol, está entre os antibióticos mais frequentemente detectados no esgoto sanitário e nos efluentes de ETEs, como pode ser observado na Tabela 2. Pode-se notar também que as remoções encontradas nos sistemas de tratamento usuais de lodos ativados não são satisfatórias, sendo os valores bastante contraditórios, não apresentando um padrão de eliminação no processo biológico. Na Figura 9 encontra-se o gráfico de boxplot referente a esses dados apresentados na literatura.

Tabela 2 - Faixas de concentrações e eficiências de remoção apresentadas na literatura acerca da ocorrência de ciprofloxacina em esgoto sanitário e efluente dos sistemas de tratamento biológico

CIP			Sistema de Tratamento	País	Referência
Afluente (ng L ⁻¹)	Efluente (ng L ⁻¹)	Remoção (%)			
200 - 1000	<LD ⁽¹⁾	100	LA ⁽²⁾	México	Brown et al. (2006)
50 - 210	<LD - 140	22 - 100	LA / VO ⁽⁴⁾	USA	Karthikeyan e Meyer (2006)
180 - 571	45 - 140	82	LA	França	Miège et al. (2009)
513	147	71	LA	Itália	Zuccato et al. (2010)
22 - 330	<LD - 26	59 - 100	LA / FB ⁽⁵⁾ / A2O ⁽⁶⁾ / AO ⁽⁷⁾	China	Zhang et al. (2017)
16 - 90	6 a 9	63 - 90	LA / OD	China	Zhou et al. (2013)
15 - 140	<LD - 55	20 - 100	LA / OD / A2O / AO	China	Gao et al. (2016)
315 - 571	61 - 87	79 - 87	LA	Suíça	Golet et al. (2003)
99	37	63	LA	China	Jia et al. (2012)
80	27	66	NS	China	Xiao et al. (2008)
320	94	71	LA	Suécia	Zorita, Mårtensson e Mathiasson (2009)
90	132	-47	NE ⁽³⁾	Austrália	Costanzo, Murby e Bates (2005)
234 - 2543	157 - 1723	-9 - 88	LA / A2O	Qatar	Al-Maadheed et al. (2019)
706 - 796	249 - 295	58 - 69	LA / FB / A2O	Irã	Mirzaei et al. (2019)

¹ Limite de detecção; ² Lodos Ativados; ³ Não Especificado; ⁴ Valo de oxidação; ⁵ Filtro Biológico; ⁶ Anaeróbio / Anóxico / Aeróbio; ⁷ Anóxico / Aeróbio.

Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Boxplot da concentração afluenta (Afl.), efluente (Efl.) e eficiência de remoção de CIP nas estações de tratamento de esgoto referente aos dados apresentados na Tabela 2

Fonte: Autoria própria.

3.4. Tratamento biológico em reatores anaeróbios de leito fixo para remoção de antibióticos

Os processos físico-químicos, tais como oxidação avançada, ozonização, radiação UV, filtração em membranas e carvão ativado, são métodos de tratamento potenciais para a melhoria na remoção de antibióticos nas estações de tratamento de esgotos usuais (ZUCCATO et al., 2006; TAMBOSI, 2008; HOMEM; SANTOS, 2011; HUANG et al., 2011; GARCÍA GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2012; LUO et al., 2014; RICHARD et al., 2014; NDAGIJIMANA et al., 2019). Porém, com a adoção de tais práticas, os custos de implantação e operação aumentam. Dessa forma, a possibilidade de biodegradação em sistemas de tratamento nas escalas de bancada, piloto e real tem sido investigada sob diferentes condições operacionais. Neste sentido, os processos mais estudados consistem de lodos ativados e biorreatores aeróbios com membrana (MBR) (CLARA et al., 2005b; MIÈGE et al., 2009; RADJENOVIC; PETROVIC; BARCELÓ, 2009; SIPMA et al., 2010; GARCÍA GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2012). Os estudos acerca de processos anaeróbios são incipientes, como pode ser notado pelas Tabelas 1 e 2, ressaltando que no Brasil a tecnologia anaeróbia para tratamento de esgotos domésticos é difundida e apresenta grande aplicabilidade (CHERNICHARO et al., 2015).

Estudos envolvendo a aplicação de reatores de leito fixo como alternativa para o tratamento anaeróbio de esgotos domésticos e industriais têm aumentado nos últimos anos. O reator de leito fixo consiste em um reator biológico no qual a biomassa está aderida sobre um material suporte, formando um biofilme. Alguns materiais suporte têm sido empregados neste tipo de reator, tais como: polietileno de baixa densidade, espuma de poliuretano e cerâmica. Entre as vantagens desta configuração de reator pode ser mencionado sua capacidade em manter alto tempo de retenção celular (alta concentração de biomassa ativa), mesmo quando operado em baixo TDH; alto desempenho e estabilidade operacional; e baixo teor de sólidos suspensos no efluente (CUEL et al., 2011; MOCKAITIS et al., 2014). Além disso, a formação do biofilme pode aumentar a resistência a compostos tóxicos e recalcitrantes, possibilitando a biodegradação destes (CASAS et al., 2015). A manutenção de um alto tempo de retenção celular (TRC) é essencial para promover a remoção e degradação de micropoluentes no esgoto. Este aumento do TRC permite o enriquecimento de bactérias de crescimento lento e também o estabelecimento de uma biocenose mais diversa capaz de degradar micropoluentes, com a presença de um maior conteúdo enzimático no substrato disponível para a degradação destes compostos (CLARA et al., 2005b; JOSS et al., 2005; LUO et al., 2014; GRANDCLÉMENT et al., 2017).

O reator anaeróbio de leito empacotado possui uma conformação do leito randômica, preenchendo todo o leito reacional, e que é tradicionalmente usada nos reatores de leito fixo. Entretanto, esta configuração pode apresentar alguns problemas operacionais, tais como a diminuição do TDH, devido à colmatação do leito ao longo do tempo, presença de caminhos preferenciais, zonas de curto-circuito, maior resistência a transferência gasosa da zona de reação para o headspace. De forma a evitar estes potenciais problemas, o reator de leito fixo ordenado surge como alternativa ao ordenar o escoamento, por meio de uma conformação do leito organizada paralelamente ao fluxo do reator. Em contrapartida, para um mesmo volume reacional, esta configuração de reator possui uma superfície específica menor para a adesão da biomassa comparada ao reator de leito empacotado, uma vez que ele não preenche todo o leito reacional, gerando uma porosidade do leito maior. A configuração do leito fixo estruturado foi inicialmente proposta por Mockaitis et al. (2012) e tem sido usada para variadas aplicações desde então.

A espuma de poliuretano tem sido aplicada nos reatores de leito fixo em escala de bancada e piloto como material suporte para imobilização de biomassa. Na Tabela 3 são apresentados alguns desses estudos e os resultados alcançados. Gijzen et al. (1988) e Varesche et al. (1997) observaram que as matrizes de espuma de poliuretano (EPU) oferecem excelentes condições

para crescimento e adesão da biomassa anaeróbia. Outras vantagens da utilização de espumas de poliuretano são sua alta porosidade, baixo custo e fácil aquisição.

Tabela 3 - Pesquisas utilizando EPU como material suporte para imobilização da biomassa em reatores de leito fixo

Tipo de reator	Aplicação	Substrato de Alimentação	Remoção (%)	Referência
Leito ordenado anaeróbio	Remoção de matéria orgânica (DQO)	Efluente lab-made simulando esgoto sanitário	78 % DQO	Mockaitis et al. (2014)
Leito ordenado sob aeração intermitente	Remoção de matéria orgânica e nitrogênio (NT)	Efluente lab-made simulando esgoto sanitário após remoção de óleos e graxas	89 % DQO 82 % NT	Moura, Damianovic e Foresti (2012)
Leito ordenado sob aeração intermitente	Remoção de nitrogênio sob diferentes relações C/N	Efluente lab-made simulando esgoto sanitário após remoção de óleos e graxas	84,6 % NT	Santos et al. (2016)
Leito empacotado anaeróbio-aeróbio	Remoção de nitrogênio e matéria orgânica	Efluente de indústria alimentícia produtora de aminoácido para nutrição animal	97 % DQO 77 % NT	Araujo Jr. e Zaiat (2009)
Leito empacotado RAHLF*	Remoção de antibiótico sulfametazina (SMZ)	Efluente lab-made simulando água residuária de suinocultura	74 % SMZ	Oliveira, Santos-Neto e Zaiat (2017)
Leito empacotado RAHLF	Remoção de antibiótico SMZ	Efluente lab-made simulando esgoto sanitário	62 % SMZ	Oliveira et al. (2019)
Leito ordenado anaeróbio	Remoção de antibiótico SMZ	Efluente lab-made simulando esgoto sanitário	55 % SMZ	Romeiro et al. (2017)
Leito Empacotado RAHLF	Remoção de antibióticos SMX e CIP	Efluente lab-made simulando esgoto sanitário	97 % CIP 97 % SMX	Chatila et al. (2016)
Leito ordenado anaeróbio	Remoção de sulfato (SO_4) e matéria orgânica	Efluente lab-made simulando a fração solúvel da vinhaça	96 % DQO 97 % SO_4	Godoi, Damianovic e Foresti (2015)
Leito ordenado anaeróbio	Remoção de sulfato e matéria orgânica	Efluente lab-made simulando esgoto doméstico	82 % DQO 89 % SO_4	Camiloti et al. (2014)

* Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo

Fonte: A autoria própria.

3.5. Mecanismos envolvidos na remoção de antibióticos

Para se entender o destino dos fármacos em uma ETE deve-se avaliar os principais mecanismos de remoção atuantes, que por sua vez são definidos pelas propriedades físico-químicas dos micropoluentes, pela configuração dos sistemas de tratamento, pelas condições ambientais e pelos parâmetros operacionais das unidades de tratamento (CARBALLA et al.,

2004; AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013). Os principais mecanismos envolvidos na remoção de fármacos nas ETEs compreendem geralmente a sorção e a degradação microbiana (CARBALLA; OMIL; LEMA, 2005; LI; ZHANG, 2010), descritos nas seções seguintes. Processos de degradação abiótica e volatilização também serão discutidos.

3.5.1. Sorção

A sorção ocorre principalmente por meio de mecanismos de absorção e de adsorção. A absorção envolve interações hidrofóbicas dos grupos alifáticos e aromáticos dos compostos com a membrana celular lipofílica de alguns microrganismos e/ou com a fração lipídica do lodo. Essas interações são caracterizadas pelos valores de K_{ow} (coeficiente de distribuição octanol-água). Já a adsorção ocorre devido às interações eletrostáticas entre os grupamentos de carga positiva (por exemplo, grupo amino) e a superfície da membrana dos microrganismos carregada negativamente. Dessa forma, essas interações eletrostáticas estão relacionadas à tendência da substância em ser ionizada ou dissociada na fase aquosa, que é caracterizada pela constante de dissociação pK_a (SIEGRIST et al., 2003; CARBALLA; OMIL; LEMA, 2005; CIRJA et al., 2008).

O comportamento de sorção pode ser estimado com o auxílio do coeficiente de sorção K_D (coeficiente de distribuição sólido-água), que é dependente das características do composto e do tipo de lodo, e envolve tanto os mecanismos de absorção quanto de adsorção, podendo ser expresso pela Equação 1 (CARBALLA et al., 2008; POLESEL et al., 2015). De acordo com Ternes et al. (2004), em geral, valores de $\log K_D$ menores ou iguais a 2 indicam tendência quase nula para sorção; entre 2 e 2,7, baixa tendência para sorção; e maior que 2,7, alta tendência de sorção em matriz sólida.

$$K_D = \frac{C_X}{C_{liq}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

K_D é o coeficiente de de distribuição sólido-água em $L \text{ kg}^{-1}SS$;

C_X é a concentração da substância na fase sólida em $ng \text{ kg}^{-1}SS$ (ou $\mu g \text{ kg}^{-1}SS$);

C_{liq} é a concentração da substância na fase aquosa em $ng \text{ L}^{-1}$ (ou $\mu g \text{ L}^{-1}$).

Os antibióticos SMX e CIP, que apresentam $\log K_{ow} = 0,89$ e $0,28$ (LI e ZHANG, 2010), respectivamente, são caracterizados por alta hidrofilicidade e baixa tendência de absorção na biomassa e nas frações lipídicas dos sólidos suspensos (PHAN et al., 2018), ao contrário de contaminantes ambientais altamente lipofílicos, como as bifenilas policloradas (PCB) e os pesticidas organoclorados, como aldrin, dieldrin e DDT que não são ionizáveis (TER LAACK et al., 2005; KÜMMERER, 2009). Dessa forma, em geral, o comportamento de sorção dos antibióticos é governado pelos mecanismos de interações iônicas, que são influenciados pelo pH, potencial redox, estrutura química do composto e da matriz sorvente (KÜMMERER, 2009).

Kümmerer (2009) aponta que a difusão e sorção de antibióticos nos biofilmes dos lodos das estações de tratamento ou em sedimentos de rios e lagos, pode ser um risco, uma vez que as concentrações nesses “reservatórios” de antibióticos se torna maior que a da fase aquosa, sendo que os efeitos disso ainda não estão elucidados, por exemplo no que diz respeito às circunstâncias em que eles ficam biodisponíveis e ativos, bem como com relação aos compostos conjugados e outros metabólitos formados após a sorção.

3.5.2. Biodegradação

Os trabalhos apresentados na literatura que envolvem estudos de biodegradação de antibióticos são focados em processos aeróbios, sendo que os mecanismos envolvidos e rotas metabólicas na biotransformação anaeróbia dos compostos farmacêuticos ainda é pouco explorada (GHATTAS et al., 2017). Segundo Joss et al. (2006), a biodegradação de contaminantes persistentes varia para cada composto em específico, devendo ser avaliada experimentalmente para cada caso.

A presença de anéis aromáticos e halogenação na molécula do fármaco tendem a aumentar a resistência a biodegradação, como é o caso das sulfonamidas e fluoroquinolonas. Segundo Virkutyte, Varma e Jegatheesan (2010), quando a carga orgânica específica é baixa, os microrganismos geralmente são forçados a mineralizar compostos orgânicos dificilmente biodegradáveis. Yuan, Guo e Yang (2015) apontam ainda que uma maior carga orgânica específica poderia aumentar a população de bactérias resistentes a antibióticos e promover a lavagem de microrganismos que biodegradam compostos farmacêuticos.

Segundo Siegrist et al. (2003), a biodegradação aeróbia de micropoluentes persistentes presentes no esgoto pode ser feita de duas formas distintas: por meio de co-metabolismo em que os microrganismos parcialmente quebram ou convertem a molécula, não utilizando-a como

fonte de carbono; ou por meio de crescimento a partir de substrato misto, em que a bactéria usa a substância como fonte de carbono e energia, mineralizando-a. Essa biotransformação ou decomposição é dependente, também, da afinidade do composto com as enzimas microbianas. A idade do lodo (ou tempo de retenção celular) também é um fator importante para aumentar a chance de biodegradação, uma vez que em altos valores de TRC, as associações simbióticas entre as bactérias tornam-se mais diversificadas, tornando possível o estabelecimento de bactérias de crescimento mais lento.

Devido as baixas concentrações dos micropoluentes presentes nas águas, a biodegradação segue cinética de pseudo-primeira ordem, conforme Equação 2. Joss et al. (2006), estudando a remoção de vários micropoluentes em sistemas aeróbios do tipo lodos ativados e MBR, concluíram que, para compostos com valores de k_{bio} menores que $0,1 \text{ L gSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ não foi observada remoção significativa por biodegradação; para compostos com valores de k_{bio} maiores que $10 \text{ L gSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$, constatou-se mais de 90 % de remoção por biodegradação; e para valores entre $0,1$ e $10 \text{ L g}^{-1} \text{SS d}^{-1}$, a biodegradação foi moderada.

$$\frac{dC}{dt} = k_{bio} \cdot X_{SS} \cdot C \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

C é a concentração da substância em $\mu\text{g L}^{-1}$;

k_{bio} é a constante de biodegradação de pseudo-primeira ordem em $\text{L g}^{-1} \text{SS d}^{-1}$;

X_{SS} é a concentração de sólidos suspensos em gSS L^{-1} .

Suarez, Lema e Omil (2010) obtiveram k_{bio} de $0,3 \text{ L g}^{-1} \text{SS d}^{-1}$ para SMX em lodos ativados com TDH de 1 dia e constataram resistência do fármaco à biodegradação aeróbia. Li e Zhang (2010), obtiveram 39 % de remoção de SMX por biodegradação após 48 h em lodos ativados em batelada, sendo nenhuma remoção devida a processo sortivo. O valor de k_{bio} encontrado por esses autores foi de $0,12 \text{ L g}^{-1} \text{SS d}^{-1}$. De acordo com Müller et al. (2013), os estudos a respeito da biodegradação de SMX se mostram incipientes, sendo necessário conhecimento mais aprofundado a respeito dos metabólitos formados e a realização de ensaios em reatores contínuos e com períodos suficientes de adaptação da biomassa. Esses autores estudaram a biodegradação de SMX em condições mesofílicas aeróbias, e concluíram que a biodegradação ocorre principalmente por meio de dois grupos microbianos: bactérias heterotróficas que assimilam SMX como fonte de carbono e bactérias autotróficas nitrificantes que oxidam o

grupo funcional amino do anel aromático da molécula de SMX. Algumas possíveis rotas metabólicas para biotransformação de SMX durante a digestão anaeróbia compreendem a redução do grupo sulfonil ($R-SO_2-R$) (GHATTAS et al., 2017) e a clivagem do anel isoxazol sob condições de redução de sulfato e de ferro (JIA et al., 2017). Drillia et al. (2005) provaram que o SMX é biodegradado, servindo como fonte de carbono e nitrogênio para as bactérias aeróbias em sistema de lodos ativados, principalmente quando ocorre depleção dessas fontes no tanque de aeração.

Li e Zhang (2010) obtiveram 32,2 % de remoção de CIP por biodegradação após estabelecido o equilíbrio sortivo em lodos ativados de efluente salino ao final de 48 h de batelada e k_{bio} de $0,07 \text{ L g}^{-1} \text{SS d}^{-1}$. Batt, Kim e Aga (2007) obtiveram, em estudos similares, 85 % de remoção de CIP por adsorção e nenhuma biodegradação ocorreu em 6 h. Já Jia et al. (2018), avaliando a biodegradação de CIP em condição anaeróbia sulfetogênica, obtiveram 28 % de remoção de 5 mgCIP L^{-1} . Pan et al. (2018) isolaram *Thermus sp.* de um lodo proveniente de uma indústria farmacêutica de produção de antibióticos e atingiram 57 % de remoção de 5 mgCIP L^{-1} por meio da degradação microbiana.

3.5.3. Degradação abiótica e volatilização

A degradação abiótica compreende processos não mediados por microrganismos e pode ser via química (por exemplo hidrólise) ou física (fotólise) e sua importância na remoção de micropoluentes no esgoto tem se mostrado bastante limitada comparada à biodegradação e sorção (CIRJA et al., 2008).

Se o composto é sensível a luz, a foto-decomposição pode assumir maior significância no processo de eliminação. Na superfície da água, a decomposição fotoquímica pode ter papel importante, dependendo da intensidade e frequência da luz e ausência de turbidez. Ressalta-se que a degradação ou transformação fotoquímica pode levar a compostos mais ou menos tóxicos e/ou estáveis do que os compostos inalterados. Quinolonas e sulfonamidas são resistentes a hidrólise e sensíveis a luz, mas não necessariamente fotodegradáveis (KÜMMERER, 2009). Em geral a fotodegradação natural de fármacos é um mecanismo desprezível nas ETEs usuais, que empregam somente processos biológicos. Em sistemas compactos, a área superficial disponível para incidência solar é pequena, sendo restrita apenas às primeiras camadas da coluna d'água em unidades abertas como os decantadores (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

A remoção de micropoluentes por volatilização depende da constante da Lei de Henry (H) e do coeficiente de distribuição octanol-água (K_{ow}). Compostos que apresentam relação H/K_{ow} menor que 10^{-9} , têm baixo potencial para volatilização, como é o caso do sulfametoxazol ($H = 6,4 \cdot 10^{-13} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ e $H/K_{ow} = 8,3 \cdot 10^{-14}$) e da ciprofloxacina ($H = 5,1 \cdot 10^{-19} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ e $H/K_{ow} = 2,7 \cdot 10^{-19}$), podendo a remoção desses compostos ser desprezada por esse mecanismo (CIRJA et al., 2008; LI; ZHANG, 2010). Alvarino et al. (2014) estudaram a remoção de dezesseis micropoluentes orgânicos, incluindo SMX, no processo de lodos ativados e constataram que a volatilização foi relevante apenas na eliminação de celestolide, uma fragrância sintética que possui $H = 5,4 \cdot 10^{-3} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ e $H/K_{ow} = 9,5 \cdot 10^{-4}$.

3.6. Influência das etapas da digestão anaeróbia sobre a remoção de micropoluentes orgânicos

A digestão anaeróbia compreende uma série de etapas que promovem a conversão da matéria orgânica em biogás (composta principalmente por metano e gás carbônico). Essas etapas incluem principalmente hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 10). Assim, o processo ocorre sobretudo por meio da associação entre microrganismos fermentativos, acetogênicos e metanogênicos. O consumo de hidrogênio, formiato e acetato pelos microrganismos metanogênicos afeta o metabolismo das outras comunidades microbianas. A formação de produtos pelas bactérias fermentativas é deslocada para produtos mais oxidados, os ácidos graxos voláteis, enquanto que as bactérias acetogênicas são apenas capazes de metabolizar compostos quando as arqueias metanogênicas consomem hidrogênio e formiato eficientemente (STAMS et al., 2012).

convertida naturalmente em estradiol (E2) sob condição anaeróbia (JOSS et al., 2004), a remoção desses compostos é representada em conjunto (E1 + E2).

Figura 11 - Faixas de remoção encontradas na literatura para vários MPOs em sistemas biológicos anaeróbios. Detalhes são fornecidos nas Tabelas 4 e 5

Fonte: Autoria própria.

Nos estudos realizados, em geral, os mecanismos envolvidos na remoção desses compostos não estão elucidados. Gonzalez-Gil, Carballa e Lema (2017) enfatizam que é essencial compreender as rotas metabólicas envolvidas na biotransformação dos micropoluentes de forma a estimar os riscos ambientais e os produtos de transformação que podem ser gerados no processo. Esses autores investigaram os mecanismos de transformação de vinte MPOs (incluindo fragrâncias sintéticas, anti-inflamatórios, antibióticos, fármacos psicoativos e desreguladores endócrinos), durante a etapa metanogênica, com foco no papel da enzima acetato-kinase, que é uma enzima chave na produção de metano. Os autores concluíram que a fase metanogênica contribui significativamente para a remoção de vários MPOs durante a digestão anaeróbia, porém sugeriram que as outras etapas da digestão anaeróbia (como hidrólise e acidogênese) podem também contribuir na eliminação de MPOs, por meio de mecanismos enzimáticos específicos de cada etapa.

Tabela 4 - Eficiências de remoção de MPOs encontradas na literatura em sistemas anaeróbios. A descrição dos sistemas e as condições operacionais são detalhadas na Tabela 5

SMX	TMP	ROX	HHCB	IBP	NPX	DCF	FLX	CBZ	NP	BPA	TCS	E1+E2	EE2	Ref.
79	77	87	0-18	30	100	-	69	38	-	-	18	0	75-89	1
99	-	94	69	41	88	69	-	0	-	-	-	88	86	2
99	-	90	66	44	89	60-73	-	0	-	-	-	85	75-85	3
100	100	65	-	-	-	25	-	0	-	-	30	-	-	4
90	98	13	38	15	95	2	12	6	-	-	-	-	50	5
91	79	32	15	20	93	16	8	20	-	-	-	0	0	6
-	-	-	-	97	86	96	-	-	33-79	77-88	64-81	-	-	7
-	-	-	-	81	87	-	-	-	0	35	22	-	-	8
-	100	-	-	17-28	87-96	25	0	7-15	-	-	-	0-7	2-17	9
-	-	-	0-45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-100	-	-	10-57	4-43	11
-	-	-	-	-	-	-	32	-	-	-	-	-	-	12
-	80-95	-	-	0-20	92	2	18-52	0	-	0	45-58	-	-	13
-	-	-	-	-	-	64	-	51	-	-	50-74	-	-	14
53	70	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	15
-	-	-	7	-	-	-	-	-	0	3	65	-	-	16
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-25	0-10	17
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	38	18
-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	19
-	-	-	-	-	-	-	-	-	46	-	-	-	13	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	30-65	-	-	-	-	21
95	35	-	-	0	70	0	-	5	99	32	90	-	15	22
99	98	-	-	25	75	3	-	39	94	100	70	-	-	23
74	84	-	-	0	85	0	-	9	-	0	33	-	-	24
-	-	-	34-49	10-21	12	-	-	9	-	-	18-32	-	-	25
-	-	-	20	30	-	60	-	-	-	-	40	-	-	26
98	98	20	-	2	89	10	-	-	-	1-7	-	-	23-33	27
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	68	28
-	95	-	-	0	-	22	-	-	-	-	-	-	-	29
100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Condições operacionais e tipo de tratamento anaeróbio empregado em cada estudo referente à Tabela 4

Referência (Ref.)	Tipo de reator anaeróbio	T (°C)	TRC ¹ (d)
1 - Gonzalez-Gil et al. (2016)	Digestor escala bancada	37-55	20-30
2 - Carballa et al. (2007)	Digestor escala bancada	37	10-30
3 - Carballa et al. (2006)	Digestor escala bancada	37-55	10-30
4 - Narumiya et al. (2013)	Digestor escala plena	30-55	20-30
5 - Alvarino et al. (2014)	UASB ² escala de bancada	20-22	>100
6 - Alvarino et al. (2016b)	UASB escala piloto	20-22	>100
7 - Samaras et al. (2014)	Digestor escala bancada	37-55	8-20
8 - Samaras et al. (2013)	Digestor escala plena	37	17
9 - Malmborg e Magnér (2015)	Digestor escala bancada	38	20
10 - Clara et al. (2011)	Digestor escala plena	37	15-20
11 - Paterakis et al. (2012)	Digestor escala bancada	35-55	15-30
12 - Bergersen, Hanssen e Vasskog (2012)	Digestor escala bancada	37	20
13 - Yang et al. (2016)	Digestor escala plena	35	15-30
14 - Zhou et al. (2017)	Digestor escala bancada	35-55	10-20
15 - Brandt et al. (2013)	UASB escala piloto	21	NE ³
16 - Leal et al. (2010)	UASB escala de bancada	32	>100
17 - Des Mes et al. (2008)	Batelada escala de bancada	30	45-256
18 - Des Mes et al. (2008)	UASB escala piloto	25	164
19 - Hernandez-Raquet et al. (2007)	Batelada escala de bancada	30	20
20 - Ifelebuegu (2011)	Digestor escala plena	37	13
21 - Mailler et al. (2014)	Digestor escala plena	37	16
22 - Monsalvo et al. (2014)	AnMBR ⁴ lab scale	30	30
23 - Wijekoon et al. (2015)	AnMBR lab scale	35	180
24 - Phan et al. (2018)	Digestor escala piloto	35	NE
25 - Reyes-Contreras et al. (2011)	UASB escala piloto	17.2	NE
26 - Butkovskiy et al. (2018)	UASB escala de bancada	25	NE
27 - Arias et al. (2018)	UASB escala piloto	21	NE
28 - Esperanza et al. (2007)	Digestor escala piloto	NE	NE
29 - De Graaff et al. (2011)	UASB escala de bancada	25	254
30 - Mohring, Strzysch e Fernandes (2009)	Batelada escala de bancada	37	NE

¹ Tempo de retenção celular; ² Upflow Anaerobic Sludge Blanket; ³ Não Especificado;

⁴ Biorreator anaeróbio de membrana.

Fonte: Autoria própria.

Vale ressaltar que os microrganismos e as enzimas microbianas da etapa hidrolítica / acidogênica são usualmente menos específicos e sensíveis à presença de compostos tóxicos ou xenobióticos comparado aos microrganismos metanogênicos (GARCÍA-MORALES et al., 2001). Ademais, alguns autores (HAMMILL; CRAWFORD, 1996; CARMONA et al., 2009; MECKENSTOCK et al., 2016) indicam que os microrganismos fermentativos são capazes de

usar compostos orgânicos contendo anéis aromáticos como receptores de elétrons (tais como benzeno, xileno, benzoato, fenol e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). Duan et al. (2019) recentemente provaram que o nonilfenol é biotransformado sob condições acidogênicas. Dessa forma, é de suma importância avaliar a contribuição de cada etapa da digestão anaeróbia de forma a otimizar a remoção de MPOs durante o processo.

3.7. Produtos gerados pela degradação biológica de antibióticos

Durante os processos biológicos de tratamento, os micropoluentes, ao serem parcialmente degradados, geram inúmeros produtos de degradação que podem se tornar moléculas mais tóxicas do que os compostos não metabolizados (DE WITTE et al., 2011; MAJEWSKY et al., 2014). Achermann et al. (2018) enfatizam a importância de se focar no estudo de produtos de degradação de antibióticos, uma vez que esses ainda podem apresentar atividade antimicrobiana, sendo observadas poucas alterações na molécula original.

Os estudos a respeito dos produtos de degradação dos antibióticos estão mais focados em processos oxidativos avançados, como ozonização e fotocatalise, sendo a concentração inicial empregada da ordem de mg L^{-1} (HU et al., 2007; PAUL; MILLER; STRATHMANN, 2007; DANTAS et al., 2008; DE WITTE et al., 2009), o que geralmente não reflete os níveis encontrados nas matrizes ambientais. Estudos acerca das rotas metabólicas de biotransformação anaeróbia de antibióticos se mostra incipiente (ALVARINO et al., 2016a) e há poucos estudos considerando as concentrações desses fármacos tipicamente encontradas em sistemas anaeróbios.

A identificação dos produtos de transformação constitui um grande desafio analítico, sendo que os principais fatores que dificultam a análise desses metabólitos são: a estrutura química dos intermediários ser desconhecida, embora se possa supor que os principais produtos de degradação estejam estruturalmente relacionados à molécula precursora; rara existência de padrão analítico para auxiliar na elucidação da estrutura; e o fato dos produtos de degradação estarem presentes em baixas concentrações nos diversos compartimentos ambientais (de pg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) (DE WITTE et al., 2011). Devido à complexidade da matriz do esgoto, contendo diversos compostos orgânicos do metabolismo microbiano, são requeridas técnicas altamente eficientes de preparo de amostra, com altos fatores de concentração, acopladas a métodos analíticos de alta seletividade e sensibilidade. A maioria das estratégias de identificação de metabólitos a partir da biotransformação de antibióticos tem-se baseado na cromatografia

liquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (ToF, Orbitrap, QToF e LTQ-Orbitrap) (KOSJEK; HEATH, 2008; BLETSOU et al., 2015).

Na Figura 12 são apresentadas algumas rotas metabólicas de biodegradação aeróbia de SMX (MÜLLER et al., 2013). Observa-se quebra da ligação do grupo sulfonil com o grupo amino-isoxazol, e perda de um grupo amino e hidroxilação do anel benzeno. Poirier-Larabie, Segura e Gagnon (2016), estudando a degradação de SMX sob diferentes condições redox, também constataram, em condições aeróbia e anaeróbia, perda do grupamento amino na molécula, gerando o metabólito de m/z $[M+H] = 239$, conforme pode ser observado na Figura 13. Jia et al. (2017) identificaram alguns produtos de transformação de SMX em condição anaeróbia de redução de sulfato e propuseram rotas metabólicas para os produtos encontrados, conforme detalhado na Figura 14. Pode-se observar que houve clivagem e hidroxilação do anel isoxazol e não foram constatadas alterações no anel anilina.

Para a ciprofloxacina também já foram identificados alguns produtos de biodegradação, porém a maioria dos estudos são focados em culturas puras e ensaios em bateladas de longa duração. Pan et al. (2018) identificaram sete produtos de biotransformação (Figura 15) da CIP por cultura pura de *Thermus sp.* isolada de um lodo proveniente de uma indústria farmacêutica de produção de antibióticos e previamente adaptada à fluoroquinolona. Em condição anóxica, Liu et al. (2013) observaram que a CIP foi biotransformada, porém os metabólitos identificados mantiveram a estrutura molecular da fluoroquinolona intacta (Figura 16). Estudos recentes de Jia et al. (2018) identificaram cinco produtos de biotransformação em condição anaeróbia sulfetogênica, bem como propuseram as rotas metabólicas para a geração dos produtos, conforme detalhado na Figura 17. Observa-se que, em geral, os produtos de biotransformação da CIP são originados a partir da quebra ou alteração do anel piperazina, sendo também constatada a hidroxilação da molécula, clivagem do grupo ciclopropil e da ligação C–F em alguns casos.

Figura 12 - Potenciais metabólitos formados a partir da biodegradação aeróbia de SMX

Fonte: Adaptado de Müller et al. (2013).

Figura 13 - Metabólito da biodegradação de SMX identificado em condições anaeróbias e aeróbias

Fonte: Adaptado de Poirier-Larabie, Segura e Gagnon (2016).

Ressalta-se a importância do estudo dos produtos de biotransformação a partir de antibióticos, uma vez que a remoção desses compostos observada nos processos biológicos de tratamento pode não denotar a eliminação da atividade antimicrobiana, atrelada aos metabólitos formados, ainda bioativos. Ademais, além dos estudos a respeito desses metabólitos serem escassos, há uma grande lacuna na literatura no que tange à identificação de intermediários da degradação de fármacos em reatores anaeróbios de fluxo contínuo e para as concentrações tipicamente encontradas nas diversas matrizes ambientais.

Figura 14 - Estruturas moleculares propostas para os produtos de transformação de SMX identificados em condição anaeróbia sulfetogênica

Fonte: Adaptado de JIA et al. (2017).

Figura 15 - Estruturas moleculares propostas para os produtos da biodegradação de CIP pela cultura isolada *Thermus sp.*

Fonte: Adaptado de PAN et al. (2018).

Figura 16 - Produtos de biotransformação de CIP em condição anóxica sem alteração da molécula de fluoroquinolona

Fonte: Adaptado de Liu et al. (2013).

Figura 17 - Estruturas propostas dos produtos de biotransformação de CIP identificados em condição anaeróbia sulfetogênica

Fonte: Adaptado de Jia et al. (2018).

3.8. Efeitos ecotoxicológicos dos antibióticos

O consumo contínuo de medicamentos representa uma ameaça potencial à saúde pública, embora se deva ter em mente que ainda é impossível avaliar os efeitos da exposição sobre a saúde humana. Por sua vez, muitos organismos não-alvo são inadvertidamente expostos a substâncias bioativas liberadas no ambiente pelo uso desses compostos farmacêuticos (DAUGHTON; TERNES, 1999). Uma maneira abrangente de avaliar os efeitos toxicológicos dos fármacos sobre a biota é por meio de testes específicos abrangendo efeitos agudos, nos quais as taxas de mortalidade são frequentemente registradas; ou efeitos crônicos, por meio da exposição a diferentes concentrações do composto químico ao longo de um período prolongado de tempo, podendo ser avaliados diferentes parâmetros, tais como índice de crescimento ou taxas de reprodução (CRANE; WATTS; BOUCARD, 2006).

Os estudos apresentados na literatura a respeito de testes ecotoxicológicos envolvendo compostos farmacêuticos são, em sua maioria, relacionados a ensaios agudos, sendo que as concentrações utilizadas nestes ensaios geralmente não representam as concentrações tipicamente encontradas nas diferentes matrizes ambientais, salvo em casos de descargas acidentais envolvendo medicamentos, durante as quais pode ocorrer uma exposição aguda aos fármacos. Resultados referentes a ensaios crônicos são escassos, possivelmente devido à complexidade na condução dos experimentos e avaliação de parâmetros ecotoxicológicos para as faixas de concentração tipicamente encontradas nas matrizes ambientais (SANTOS et al., 2010).

A presença de antibióticos nos afluentes das ETEs pode ser prejudicial ao sistema biológico, uma vez que podem inibir a atividade de microrganismos responsáveis pelo tratamento, como já foi observado para o caso da atividade de bactérias nitrificantes de lodos ativados (HALLING-SØRENSEN et al., 1998). Os agentes antimicrobianos e os seus metabólitos gerados nos sistemas de tratamento de efluentes, por ainda apresentarem atividade biológica, podem causar efeitos adversos sobre as espécies não-alvo em diferentes níveis da cadeia trófica nos ecossistemas aquáticos e / ou terrestres, bem como contribuir para um desbalanceamento na cadeia alimentar, pois podem agir diretamente sobre microrganismos e algas importantes na nutrição, metabolismo e ciclo de vida de organismos de níveis tróficos superiores (ISIDORI et al., 2005; NIE et al., 2013).

Na Tabela 6 são apresentados alguns estudos envolvendo ensaios ecotoxicológicos dos antibióticos SMX e CIP sobre diferentes organismos-teste. Pode-se observar que os antimicrobianos citados podem causar efeitos agudos e crônicos em faixas de concentração bem

superiores aos valores frequentemente encontrados no esgoto sanitário e efluentes de ETEs (Tabelas 1 e 2). No entanto, ressalta-se que os efeitos e riscos para a biota do acúmulo desses micropoluentes no ambiente ao longo do tempo ainda são desconhecidos.

Os resultados encontrados na literatura, em geral, abordam apenas resultados de CE₅₀ (Concentração Efetiva Média), CL₅₀ (Concentração Letal Média) e CENO (Concentração de efeito não observado). Entretanto, ensaios ecotoxicológicos que envolvam uma exposição prolongada a baixas concentrações dos antibióticos, podem resultar em deficiências nos parâmetros do ciclo de vida dos organismos-teste. Por exemplo, no caso do microcrustáceo *Daphnia magna* alguns endpoints ecotoxicológicos podem ser levados em consideração para avaliação do efeito crônico, tais como alteração no tamanho dos neonatos, taxa de fecundidade e número de ninhadas por fêmea (MARTINS et al., 2012). Para o inseto *Chironomus sancticaroli* (Diptera: *Chironomidae*), alguns endpoints ecotoxicológicos que podem ser utilizados para avaliação de efeito crônico de micropoluentes sobre a espécie são o comprimento larval, o comprimento da asa relacionado com a fecundidade potencial, a taxa de fecundidade e a taxa de emergência de adultos (STRIXINO; STRIXINO, 1985).

Tabela 6 - Parâmetros Ecotoxicológicos avaliados em diferentes organismos-teste expostos a SMX e CIP

Organismo Teste	Endpoint Ecotoxicológico	Analito	Concentração (mg L ⁻¹)	Referência
<i>Vibrio fischeri</i>	CE ₅₀ (inibição de luminescência - 15 min)	SMX	78,1	Kim et al. (2007)
	CE ₅₀ (inibição de luminescência - 30 min)	SMX	23,3	Isidori et al. (2005)
	CE ₅₀ (inibição de luminescência)	CIP	> 5,9	Hernando et al. (2007)
	CE ₅₀ (inibição de luminescência)	CIP	11,5	Martins et al. (2012)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 72 h)	SMX	0,52	Isidori et al. (2005)
	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 96 h)	CIP	4,83	Martins et al. (2012)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	CE ₅₀ (inibição de crescimento)	SMX	1,53	Eguchi et al. (2004)
	CENO (inibição de crescimento - 96 h)	SMX	0,614	Eguchi et al. (2004)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 96 h)	CIP	20,6	Nie et al. (2008)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 120 h)	CIP	0,017	Robinson, Belden e Lydy (2005)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (imobilização - 48 h)	SMX	189,2	Kim et al. (2007)
	CE ₅₀ (imobilização - 96 h)	SMX	177,3	Kim et al. (2007)
	CE ₅₀ (imobilização - 24 h)	SMX	25,2	Isidori et al. (2005)
	CE ₅₀ (imobilização - 48 h)	SMX	123,1	Park e Choi (2008)
	CE ₅₀ (imobilização - 48 h)	CIP	> 10	Robinson, Belden e Lydy (2005)
	CE ₅₀ (imobilização - 48 h)	CIP	65,3	Martins et al. (2012)
<i>Lemna gibba</i>	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 7 d)	CIP	0,697	Brain et al. (2004)
<i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 7 d)	CIP	3,75	Martins et al. (2012)
<i>Gambusia holbrooki</i>	CE ₅₀ (mortalidade - 96 h)	CIP	> 60	Martins et al. (2012)
<i>Oryzias latipes</i>	CL ₅₀ (48 h)	SMX	> 750	Kim et al. (2007)
<i>Hydra attenuata</i>	CL ₅₀ (morfologia - 96 h)	SMX	> 100	Quinn, Gagné e Blaise (2009)
	LOEC* (morfologia - 96 h)	SMX	10	Quinn, Gagné e Blaise (2009)
	CENO (morfologia - 96 h)	SMX	5	Quinn, Gagné e Blaise (2009)
<i>Brachionus calyciflorus</i>	CL ₅₀ (mortalidade - 24 h)	SMX	26,27	Isidori et al. (2005)
	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 48 h)	SMX	9,63	Isidori et al. (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 24 h)	SMX	15,51	Isidori et al. (2005)
	CE ₅₀ (inibição de crescimento - 7 d)	SMX	0,21	Isidori et al. (2005)
<i>Moina macrocopa</i>	CE ₅₀ (imobilização - 24 h)	SMX	84,9	Park e Choi (2008)
	CE ₅₀ (imobilização - 48 h)	SMX	70,4	Park e Choi (2008)

* Menor Concentração de Efeito Observado

Fonte: Autoria própria.

3.9. Considerações Finais

Baseando-se na revisão de literatura apresentada, reitera-se a relevância da pesquisa proposta neste estudo. Os antimicrobianos sulfametoxazol e ciprofloxacina apresentam caráter ubíquo nas diversas matrizes ambientais e as eficiências de remoção encontradas para esses fármacos nos sistemas de tratamento biológico usualmente empregados são insatisfatórias ou contraditórias, variando desde remoção nula até remoção completa em alguns casos. Ademais, os mecanismos e parâmetros operacionais das estações de tratamento de águas residuárias intervenientes na remoção biológica dos antibióticos, na maioria dos estudos, são pouco explorados.

Outra lacuna de conhecimento na biodegradação anaeróbia dos fármacos refere-se à identificação dos produtos de biotransformação gerados, e seus potenciais impactos sobre a biota e a saúde humana; e também à influência das diferentes etapas da digestão anaeróbia sobre a remoção de micropoluentes orgânicos, bem como as comunidades microbianas e mecanismos enzimáticos envolvidos no processo.

A adoção de sistemas de tratamento biológico anaeróbios alternativos aos usuais reatores UASB e digestores de lodo se faz necessária de forma a otimizar a biodegradação da matéria orgânica e de micropoluentes emergentes, notadamente os compostos antibióticos, que têm sido frequentemente detectados nas águas residuárias e de abastecimento, representando uma séria ameaça à saúde global, pelo espalhamento de genes de resistência antimicrobiana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estratégia experimental

A etapa experimental do projeto foi dividida em sete diferentes fases operacionais dos reatores com diferentes tempos de operação, conforme apresentado na Figura 18. A primeira fase consistiu na inoculação dos reatores anaeróbios de leito fixo e adaptação da biomassa às condições operacionais impostas - substrato, temperatura, pH, carga orgânica volumétrica (COV) e TDH. Após a adaptação, partiu-se para a introdução de antibiótico no substrato de alimentação (descrito na seção 4.4). Optou-se primeiramente por avaliar o comportamento individual de cada antibiótico – SMX (Fase II) e CIP (Fase III), para então aplicá-los em conjunto (Fase IV) nas mesmas concentrações – 400 ng L⁻¹.

O TDH inicial de 12 h foi adotado com base nos resultados obtidos por Chatila et al. (2016) que trabalharam com TDH de 24 h para remoção de SMX (40 µg L⁻¹) e CIP (5 µg L⁻¹) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, sendo verificada a estabilidade de concentração residual após 12 horas por meio dos perfis cinéticos espaciais do reator. Após verificado a estabilidade operacional dos reatores para o TDH de 12 h, foi feita uma avaliação do efeito da diminuição do TDH sobre a remoção dos antibióticos – Fases V (TDH = 8 h) e VI (TDH = 4 h). A redução do TDH foi estabelecida de acordo com os resultados cinéticos obtidos dos perfis espaciais dos reatores para remoção de SMX e CIP em TDH de 12 h (Fases II, III e IV).

Após avaliado os resultados para a remoção de SMX e CIP aplicando esgoto lab-made, foi avaliado o efeito da aplicação de esgoto doméstico sobre o desempenho dos reatores – Fase VII, em TDH de 12 h.

Concomitante à operação dos reatores, outros experimentos foram realizados, a saber: ensaios cinéticos, ensaios de atividade antimicrobiana, ensaios ecotoxicológicos, ensaios de sorção, ensaios microbiológicos, e ensaios para identificação dos produtos de degradação, que serão descritos nas seções seguintes.

Figura 18 - Esquema das etapas experimentais adotadas na pesquisa

Fonte: Autoria própria.

4.2. Configuração dos reatores e do material suporte

Para as etapas experimentais de I a VII foram empregadas duas configurações de reatores anaeróbios de leito fixo em fluxo ascendente – empacotado (RALFE) e ordenado (RALFO) – utilizando espuma de poliuretano (EPU) como material suporte, cujas características estão descritas na Tabela 7. Cada reator consistiu em um tubo de acrílico de diâmetro interno de 8 cm, altura do leito reacional de 35 cm e volume total útil de 2,69 L, considerando o volume na base cônica e no cabeçote do reator. Os reatores possuíam uma disposição do material suporte diferente, implicando em volume real útil também diferente, conforme descrito na Tabela 7. Na Figura 19 estão os desenhos esquemáticos das duas configurações, indicando a diferença da conformação do material suporte e a Figura 20 mostra uma foto dos reatores previamente à inoculação.

Tabela 7 - Características físicas e operacionais dos reatores anaeróbios de leito fixo em fluxo ascendente - empacotado (RALFE) e ordenado (RALFO); e da EPU empregada no leito fixo

Parâmetro	RALFE	RALFO
Volume útil sem material suporte (L)	2,09	2,51
Volume de material suporte (L)	0,6	0,18
Porosidade inicial do leito (%)*	59 %	89 %
Material suporte	Espuma de Poliuretano	Espuma de Poliuretano
Massa de EPU (g)	15,92	7,99
Porosidade EPU (%)**	92 %	92 %
Densidade aparente EPU (g L^{-1})**	23	23
Superfície específica EPU ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)**	43,8	43,8
Forma e dimensões do material suporte	Matrizes cilíndricas com diâmetro de 0,8 cm e altura de 1,2 cm envoltas em espiral de PVC	Tiras prismáticas com 1 cm de aresta e 35 cm de comprimento
Disposição do material suporte	Randômica	Vertical

* Razão entre o volume vazio e o volume total do leito drenado, considerando o reator sem biofilme.

** Fonte: SILVA et al. (2006)

Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Desenho esquemático das duas configurações de reatores propostos – RALFE e RALFO

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Figura 20 - Reatores de leito fixo empacotado (a) e ordenado (b) previamente à inoculação da biomassa

Fonte: Autoria própria.

A espuma de poliuretano foi cortada em matrizes cilíndricas (Figura 21a) para preenchimento do reator de leito empacotado e em tiras prismáticas no reator de leito ordenado (Figura 22). As matrizes cilíndricas no RALFE foram envoltas em espiral de PVC semirrígido (Figura 21b) para aumentar a resistência mecânica e diminuir a compressibilidade do leito. O leito foi separado mediante telas perfuradas de aço inoxidável, evitando uma possível flutuação ou afundamento do material suporte. O fundo dos reatores tem formato cônico para facilitar, conforme a necessidade, a retirada de biomassa acumulada.

Figura 21 - Matrizes cilíndricas de espuma de poliuretano utilizadas no RALFE – sem espiral (a) e com espiral (b)

Fonte: Autoria própria.

Figura 22 - Tiras prismáticas de EPU utilizadas no RALFO

Fonte: Autoria própria.

O nível d'água dentro do reator foi mantido por selo hídrico conectado ao medidor de biogás. Esse sistema controlava o nível do headspace, permitindo o acúmulo e a saída do biogás na parte superior do tubo acima do líquido. Os reatores foram operados sob temperatura constante em câmara mesofílica, climatizada a 30 °C.

4.3. Biomassa de inóculo e procedimento de partida

A biomassa utilizada como inóculo nos biorreatores foi proveniente de um reator UASB em operação tratando água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dacar S.A.), localizado na cidade de Tietê/SP. Esse lodo granular apresenta grande diversidade de microrganismos, conforme caracterizado por Delforno et al. (2017) e tem sido utilizado com sucesso em diversos projetos de pesquisa conduzidos no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos.

Para imobilização das espumas de poliuretano seguiu-se metodologia proposta por Zaiat, Cabral e Foresti (1994). Inicialmente o lodo granular (Figura 23a) foi batido em liquidificador. As espumas ficaram em contato com este lodo batido durante um período de 4 h e então foram transferidas para o reator. No caso do RALFO, o lodo batido foi adicionado diretamente no leite. Em ambos os reatores foi drenado o excesso de biomassa pelo fundo e então procedeu-se o início da alimentação do reator com esgoto lab-made (descrito na seção 4.4), por meio de bombas dosadoras peristálticas (Gilson MINIPULS 3). O lodo de inóculo resultante apresentou concentração inicial de sólidos da ordem de 35 gST L⁻¹ e 28 gSTV L⁻¹. Na Figura 23 podem ser observados os grânulos presentes no lodo usado como inóculo com diâmetro médio de 3,1 ± 0,5 mm (OKADA, 2012); as espumas do RALFE em contato com o lodo batido e os reatores já com biomassa imobilizada.

Figura 23 - Grânulos do reator UASB da avícola Dacar (a); espuma em contato com a biomassa (b); reatores após imobilização da biomassa (c)

Fonte: a - OKADA (2012); b e c - autoria própria.

4.4. Preparo e composição do esgoto lab-made

Para a alimentação do reator foi utilizado um esgoto lab-made que simula a fração solúvel do esgoto sanitário, com 50 % de proteína (extrato de carne), 40 % de carboidratos (20 % de sacarose, 60 % de amido e 20 % de celulose) e 10 % de lipídeo (óleo de soja emulsionado com solução detergente). A composição do substrato foi baseada em Torres (1992) modificada por Mockaitis et al. (2014) e Lima Gomes et al. (2015), sendo detalhada na Tabela 8.

O substrato de alimentação foi preparado em balde plástico, à temperatura ambiente, utilizando-se água do sistema de abastecimento e após preparado, foi armazenado sob refrigeração a 4 °C para evitar sua fermentação. Visando o tamponamento do substrato adicionou-se bicarbonato de sódio na concentração de 300 mg L⁻¹. Para emulsionar o óleo de soja preparou-se uma solução de detergente comercial (LAS – linear alquilbenzeno sulfonado) na concentração de 50 mL L⁻¹, na qual o óleo foi adicionado. Para cada litro de substrato preparado adicionava-se 1 mL da solução detergente e 35 µL de óleo.

Tabela 8 - Composição do esgoto lab-made

Componente	Concentração (mg L ⁻¹)
Sacarose	43,0
Amido	135,0
Celulose	42,5
Extrato de Carne	219,0
Óleo de Soja	31,1
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	300,0
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	15,0
Cloreto de Sódio (NaCl)	250,0
Cloreto de Cálcio Diidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	7,0
Cloreto de Magnésio Hexaidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	4,5
LAS (Surfactante Aniônico)	15,0

Fonte: Adaptado de Lima Gomes et al. (2015).

Este substrato representa uma DQO teórica total de 500 mg L⁻¹. Porém, como a dissolução dos componentes da mistura não ocorria integralmente, sobretudo devido ao amido, eram coletadas amostras na entrada do reator a fim de verificar a DQO total real na alimentação de cada reator.

Para as etapas experimentais com aplicação de antibiótico no substrato de alimentação (Fases II a VI), foram preparadas soluções estoque dos antibióticos de interesse a partir do composto original, dissolvido em metanol, ficando armazenadas em freezer (- 20 °C). Para a dissolução da ciprofloxacina foi necessária também a adição de ácido fórmico na solução estoque. A partir dessas soluções com concentração conhecida preparou-se uma solução diluída na faixa de 50 a 100 mg L⁻¹ em água ultrapura acidificada com ácido fórmico (0,1 % v/v) até pH 3, para então ser diluída no substrato de alimentação para uma concentração de aproximadamente 400 ng L⁻¹. Essa concentração de antibiótico na alimentação dos reatores foi adotada por ser tipicamente encontrada no esgoto considerando a faixa de concentração apresentada na literatura (Figuras 5 e 9), e também de acordo com os valores médios detectados em amostras de esgoto doméstico coletadas por Lima Gomes et al. (2015) na área onde foi desenvolvido este estudo.

4.5. Métodos analíticos e monitoramento do desempenho dos reatores

O monitoramento do desempenho dos reatores foi realizado por meio de análises físico-químicas conforme metodologias e frequência analítica descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Análises físico-químicas realizadas na pesquisa

Parâmetro (Unidade)	Método	Frequência (por semana)	Referência
pH	Potenciométrico	2 vezes	APHA (2005)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	Titulométrico	2 vezes	Ripley, Boyle e Converse (1986)
Ácidos Orgânicos Voláteis (mg L ⁻¹)	Cromatografia Gasosa – GC	Quinzenal	Adorno, Hirasawa e Varesche (2014)
DQO (mgO ₂ L ⁻¹)	Espectrofotométrico	2 vezes	APHA (2005)
Série de Sólidos (mg L ⁻¹)	Gravimétrico	Quinzenal	APHA (2005)
Composição do biogás (CH ₄ , CO ₂ , H ₂ S, H ₂)	Cromatografia Gasosa – GC	2 vezes	APHA (2005)
Antibióticos SMX / CIP (ng L ⁻¹)	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas – LC-MS/MS	2 vezes	Lima Gomes et al. (2015)

Fonte: Autoria própria.

O método desenvolvido por Adorno, Hirasawa e Varesche (2014) contempla sete ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e capríco), além dos solventes acetona, metanol, etanol e n-butanol, que podem ocasionalmente aparecer nas rotas metabólicas da digestão anaeróbia. O cromatógrafo utilizado foi GC-2010 Shimadzu com detector de ionização de chama (GC/FID), com coluna HP INNOWAX de 30 m x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura do filme).

Para determinar a composição do biogás (CO₂, CH₄ e H₂S) foi utilizado cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2014AT, equipado com detector de condutividade térmica (GC/TCD) e coluna HP-PLOT Q (30m x 0,53 mm x 40 µm). A temperatura do injetor era de 160 °C, do detector e do forno de 170 °C. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste. A produção de biogás nos reatores (em mL d⁻¹) foi medida por meio da técnica de deslocamento líquido, utilizando gasômetro modelo MGC- 1 V30 (Ritter).

A partir dos resultados de vazão e composição do biogás, foi possível determinar algumas variáveis-resposta acerca do desempenho da metanogênese nos reatores, tais como: vazão molar de metano (v_{CH_4} , em mmolCH₄ d⁻¹), produção volumétrica de metano (PV_{CH_4} , em mLCH₄ L⁻¹ d⁻¹) e rendimento de metano (η_{CH_4} em mLCH₄ g⁻¹DQOremovida), descritas pelas Equações de 3 a 5.

$$v_{CH_4} = \frac{Q_{biogás} \cdot n_{CH_4}}{V_i} \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

$Q_{biogás}$ é a vazão de biogás medida por meio do gasômetro em mL d⁻¹;

n_{CH_4} é o número de mols de metano em μmol obtido pela curva analítica do cromatógrafo;

V_i é o volume de biogás injetado no cromatógrafo = 500 μL .

$$PV_{CH_4} = \frac{Q_{biogás} \cdot X_{CH_4}}{V_u} \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

X_{CH_4} é a fração molar de CH₄ - número de mols de metano pelo número de mols total no biogás;

V_u é o volume útil do reator em L.

$$\eta_{CH_4} = \frac{Q_{biogás} \cdot X_{CH_4}}{Q_{afl} (DQO_{afl} - DQO_{efl})} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

Q_{afl} é a vazão de alimentação do reator em L d⁻¹;

$DQO_{afl} - DQO_{efl}$ é a DQO removida do reator em gDQO L⁻¹.

4.5.1. Determinação de SMX e CIP

Para a determinação dos antibióticos SMX e CIP foi utilizado um sistema de análise constituído por cromatógrafo a líquido Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent, EUA) e um espectrômetro de massas ABSciex QTRAP 5500 (ABSciex, Canadá), acoplado por meio de interface electrospray (ESI). As análises foram realizadas no modo SRM (selected reaction monitoring) com resolução unitária em ambos os analisadores de massas.

O método utilizado foi desenvolvido por Lima Gomes et al. (2015) e consiste em um sistema multidimensional, column-switching, o qual prepara a amostra por extração em fase sólida (SPE) online utilizando uma coluna de extração da marca Waters contendo a fase Oasis

HLB (20 mm x 2,1 mm, 25 μm) e coluna de separação da marca Agilent Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 2,1 mm, 2,7 μm). O sistema column-switching foi usado em modo backflush com inversão do sentido da eluição da coluna extratora, conforme descrito em Lima Gomes et al. (2015). A fonte de íons foi operada no modo electrospray positivo ($[M+H]^+$), segundo os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 5500 kV, temperatura de 650 $^{\circ}\text{C}$, gás de colisão em médio, cortina de gás de 20 psi, gás de aquecimento (GS1) de 50 psi e gás de nebulização (GS2) de 50 psi. A fase móvel foi constituída de água ultrapura contendo 0,1 % de ácido fórmico (Solução A) e acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (Solução B), com vazão de 0,6 mL min^{-1} .

Para a determinação da curva analítica, foram preparados padrões de SMX e CIP de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água MilliQ acidificada com ácido fórmico (98 % v/v) até pH 3. A partir destes padrões foram feitas diluições seriadas na faixa de 50 a 800 ng L^{-1} . A fim de diminuir a interferência por efeito de matriz, as diluições foram preparadas com o próprio efluente do reator anaeróbio isento de antibiótico (resultante da primeira fase operacional dos reatores). Esse efluente foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,22 μm e acidificado com ácido fórmico (98 % v/v) até pH 3.

Para minimizar erros aleatório e sistemático devido a efeitos de matriz e do preparo de amostra, foi feita adição de padrão interno (PI) em todas as amostras, com concentração final de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. As soluções estoque de PI de cada antibiótico – $^{13}\text{C}_6$ -SMX e CIP- D_8 (Figura 24) – foram preparadas na concentração de 225 $\mu\text{g L}^{-1}$. As amostras do reator tiveram o mesmo procedimento de preparo – filtração, acidificação e adição de PI. Todos os reagentes utilizados são de alta porcentagem de pureza (> 98 %) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Figura 24 - Estrutura química dos padrões internos $^{13}\text{C}_6$ -SMX (a) e CIP- D_8 (b)

Fonte: ChemSketch v. 11.0.

Para a identificação dos compostos foram analisadas três transições de SMX, CIP e $^{13}\text{C}_6$ -SMX, e duas transições de CIP- D_8 , conforme pode ser observado na Tabela 10. Apenas a

primeira transição do analito e do padrão interno foram utilizadas para a quantificação, que correspondem aquelas marcadas em negrito na tabela. As demais transições desempenharam papel confirmatório.

Tabela 10 – Transições de massas monitoradas por espectrometria para os antibióticos SMX e CIP, e seus padrões internos

Analito	Íon Precursor (M+H)⁺ (m/z)	Íon Produto (M+H)⁺ (m/z)
SMX-1	254	156
SMX-2	254	92
SMX-3	254	108
SMX-¹³C₆-1	260	114
SMX- ¹³ C ₆ -2	260	162
SMX- ¹³ C ₆ -3	260	98
CIP-1	332	288
CIP-2	332	245
CIP-3	332	231
CIP-D₈-1	340	296
CIP-D ₈ -2	340	249

Fonte: Autoria própria.

Nas Figuras 25 e 26 podem ser observados como exemplo os cromatogramas obtidos em modo SRM do ponto de concentração de 800 ng L⁻¹ para SMX e CIP com concentração final de PI de 3 µg L⁻¹. Os tempos de retenção e as transições monitoradas também estão indicadas para cada analito. Na Figura 27 observam-se as curvas analíticas obtidas para cada analito, nas quais há uma relação linear entre a razão de área analito / PI e a concentração correspondente. As curvas analíticas foram refeitas sempre que necessário: ao acabar a solução de PI; ao se perceber diminuição brusca da área do pico do PI; e troca de coluna cromatográfica. Na Figura 28 pode ser visualizado em perspectiva os cromatogramas correspondentes a curva analítica do SMX para a faixa de concentração de 50 a 800 ng L⁻¹. Os limites de detecção obtidos para as curvas de SMX e CIP foram de 4,3 e 10,3 ng L⁻¹, respectivamente.

Figura 25 - Cromatograma do íon extraído em esgoto lab-made fortificado com 800 ngSMX L⁻¹ (a) e 3 µg¹³C₆-SMX L⁻¹ (b)

Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Cromatograma do íon extraído em esgoto lab-made fortificado com 800 ngCIP L⁻¹ (a) e 3 µgCIPD₈ L⁻¹ (b)

Fonte: Autoria própria.

Figura 27 - Curvas analíticas e ajuste linear obtido para os antibióticos SMX (a) e CIP (b) em esgoto lab-made

Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Cromatogramas de massa em perspectiva referentes a curva analítica do SMX

Fonte: Autoria própria.

4.5.2. Análises microbiológicas dos reatores

Para avaliação das comunidades microbianas presentes nos reatores, foram tomadas amostras de biomassa ao longo do leito reacional após a fase operacional com esgoto lab-made (Fase VI) e com esgoto doméstico (Fase VII). Foram realizadas análises de microscopia óptica e de fluorescência, e de biologia molecular. Previamente às análises microbiológicas, a biomassa foi retirada dos fragmentos de EPU coletados ao longo do perfil espacial dos reatores por meio de lavagem com água destilada e agitação com pérolas de vidro.

Para a avaliação microscópica da biomassa, foi utilizado um microscópio óptico de contraste de fase Olympus BX60, acoplado à câmera com captura de imagem Evolution QE e software Image-Pro Plus 4.5. Uma gota de amostra era colocada sobre uma fina camada de Ágar 2 % solidificado, disposto entre lâmina e lamínula, a fim de diminuir o movimento das células na amostra.

Para a análise de biologia molecular, inicialmente a biomassa passou por um processo de centrifugação (6000 rpm, 4 °C, 10 minutos) e extração de DNA (ácido desoxirribonucleico) baseado no protocolo de Griffiths et al. (2000), utilizando tampão PBS (NaCl 137,0 mmol L⁻¹, KCl 2,6 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 1,7 mmol L⁻¹ em pH 7,4), glass beads, fenol + tampão Tris e clorofórmio (1:1:1 v/v). Os pellets foram então armazenados a – 20 °C. A purificação do DNA foi realizada com o kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” da “GE

Healthcare” (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), seguindo o protocolo do fabricante. As concentrações de DNA purificado foram obtidas em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ mediante leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000), sendo que para todas as amostras os resultados foram superiores ao mínimo recomendado de $30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Cerca de $30 \mu\text{L}$ de cada uma das amostras de DNA purificado e armazenado em substrato Tris-EDTA (TE) foram enviados para a empresa “Mr. DNA” (<https://www.mrdnalab.com>), localizada na cidade de Shallowater (Texas), nos Estados Unidos. A filogenia dos domínios Bacteria e Archaea foi realizada a partir do sequenciamento do gene 16S RNAr, com “primers” 515F/806R utilizando-se a tecnologia Illumina MiSeq.

4.6. Comportamento hidrodinâmico dos reatores

Previamente à inoculação dos reatores, foram realizados ensaios hidrodinâmicos a fim de avaliar o perfil de escoamento nos mesmos e possíveis anomalias presentes, possibilitando a detecção de caminhos preferenciais, zonas mortas e de curto-circuito, bem como o TDH real para cada biorreator. Para isso, os reatores foram preenchidos com água de abastecimento e a vazão do sistema foi adequada para TDH teórico de 4 e 12 horas, que são os extremos adotados para a operação dos reatores. Em seguida procedeu-se a alimentação com a solução do traçador (10 g L^{-1} de cloreto de sódio) no modo de injeção tipo degrau segundo Levenspiel (1999).

A concentração de sólidos totais dissolvidos (STD) efluente foi monitorada online por meio de uma sonda de condutividade acoplada a um sistema de aquisição de dados (CBL 2TM – TI 89 Texas Instruments). A sonda foi calibrada previamente com os padrões de 0 e 10 gSTD L^{-1} e automaticamente era feita a conversão da condutividade em STD. Com estes dados foi possível traçar a curva C (Concentração de traçador x tempo) e obter a curva normalizada F, para, a partir da diferenciação desta curva, obter a curva E, que representa a distribuição do tempo de residência no reator, conforme Equações 6 e 7.

$$F(t) = \frac{C_t}{C_{\text{máx}}} \quad \text{Equação 6}$$

$$F(t) = \int_0^t E(t) \cdot dt \rightarrow E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

C_t é a concentração de NaCl no tempo t ;

$C_{\text{máx}}$ é a concentração máxima de sal obtida no ensaio.

A partir da curva E pode-se determinar o TDH médio ($\bar{\theta}_h$) por meio da Equação 8.

$$\bar{\theta}_h = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot E(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} E(t) \cdot dt} = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) \cdot dt \quad \text{Equação 8}$$

A partir do TDH médio real obtido pode-se traçar a curva adimensional de distribuição do tempo de residência (E_{θ}), conforme Equação 9.

$$E_{\theta} = \bar{\theta}_h \cdot E(t) \quad \text{Equação 9}$$

Para a representação do padrão de escoamento nos reatores foi utilizado o modelo de dispersão longitudinal com a estimativa do número de dispersão (D/uL), que pode ser obtido por meio das Equações de 10 a 12. Para pequenas extensões de dispersão, ou seja, para valores de D/uL menores que 0,01, pode-se chegar na Equação 12 de ajuste do modelo, segundo Levenspiel (1999).

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \bar{\theta}_h)^2 \cdot E(t) \cdot dt \quad \text{Equação 10}$$

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{\theta}_h^2} \quad \text{Equação 11}$$

$$\frac{D}{u L} = \frac{\sigma_{\theta}^2}{2} \quad \text{Equação 12}$$

Em que:

σ^2 é a variância da curva;

σ_{θ}^2 é a variância adimensional;

D é o coeficiente de dispersão longitudinal;

u é a velocidade do fluido;

L é o comprimento do reator

Quando o número de dispersão (D/uL) tende a zero, o reator tende a tubular ideal (*plug-flow*) e quando tende ao infinito, o escoamento tende a mistura completa ideal (LEVENSPIEL, 2000).

4.7. Perfis espaciais de DQO e antibióticos para estimativa de modelos e parâmetros cinéticos

Para avaliar a cinética de remoção de SMX e CIP foram realizados perfis espaciais, por meio de amostras coletadas nos pontos laterais de cada reator, conforme esquema da Figura 29. Na Tabela 11 encontram-se os valores de L/D (relação comprimento / diâmetro) e TDH intermediários correspondentes a cada ponto de amostragem para cada TDH testado durante a operação do reator (4, 8 e 12 h). Isso pode ser feito uma vez os reatores em estudo apresentaram perfil de escoamento semelhante ao pistonado conforme os resultados dos perfis hidrodinâmicos (seção 5.1). Partindo desta consideração e assumindo que a remoção de matéria orgânica (DQO) e antibióticos (SMX e CIP) segue uma cinética de primeira ordem com concentração residual, pode-se chegar na Equação 13 descrita por Camargo et al. (2002), que expressa o modelo cinético de decaimento dos compostos citados.

Figura 29 - Desenho esquemático dos pontos laterais de coleta de amostra para o perfil cinético espacial

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - Valores de L/D e representação do TDH em cada ponto de amostragem nos reatores, considerando o escoamento como pistonado.

Ponto de Amostragem	L/D	θ_h (h)		
		4	8	12
P ₀	0,0	0,0	0,0	0,0
P ₁	1,2	0,6	1,2	1,8
P ₂	2,8	1,4	2,8	4,2
P ₃	4,3	2,2	4,3	6,5
P ₄	5,7	2,9	5,7	8,6
P ₅	7,9	4,0	8,0	12,0

Fonte: Autoria própria.

$$C = C_R + (C_0 - C_R). e^{(-k_1^{app} \cdot \theta_h)}$$

Equação 13

Em que:

C é a DQO ou concentração de SMX ou CIP (em mg L⁻¹ ou ng L⁻¹);

C_R é o residual de DQO, SMX ou CIP (em mg L⁻¹ ou ng L⁻¹);

C₀ é o inicial de DQO, SMX ou CIP (em mg L⁻¹ ou ng L⁻¹);

k₁^{app} é a constante cinética aparente de primeira ordem;

θ_h é o tempo de detenção hidráulica (em h).

4.8. Avaliação do conteúdo e perfis espaciais de biomassa nos reatores

Ao final da operação dos reatores foram tomadas amostras ao longo do perfil espacial de cada reator a fim de avaliar a composição e estratificação da biomassa no leito reacional.

Dessa forma, foi medido para cada ponto de amostragem (pontos 2, 3 e 4 – Figura 29) o conteúdo de sólidos em suspensão totais e voláteis para a biomassa aderida na EPU. Para isso, amostras de espuma inoculadas foram retiradas de cada ponto e lavadas com água destilada e com auxílio de agitação com pérolas de vidro em tubos falcon de 50 mL. As amostras resultantes foram analisadas em termos de SST, SSF e SSV e as espumas sem inóculo foram secas em estufa a 100 °C, para possibilitar a quantificação da biomassa em gSS g⁻¹EPU. O leito de cada reator foi drenado e a concentração de sólidos também foi determinada para estimativa do teor de biomassa em suspensão em cada reator.

A fim de estimar o crescimento e o acúmulo de biomassa no leito reacional ao longo do tempo de operação dos reatores, foi adotado como coeficiente de rendimento celular o valor de 0,1 kgSST kg⁻¹DQOaplicada, valor usual no tratamento anaeróbio de esgoto doméstico, segundo Chernicharo (2015). Dessa forma, foram calculados os valores de biomassa gerada (produção de sólidos) nos reatores, bem como a biomassa lavada do sistema (arraste de sólidos), conforme apresentado nas Equações 14 e 15. Outros parâmetros referentes ao conteúdo de biomassa, tais como a carga orgânica específica (COE) e o tempo de retenção celular (TRC), foram calculados pelas Equações 16 e 17. Esses parâmetros estão relacionados à operação dos reatores, mas também podem estar ligados a biodegradabilidade dos antibióticos.

$$PS = Y_{biomassa} \cdot Q_{afl.} \cdot DQO_{afl.} \quad \text{Equação 14}$$

$$AS = Q_{efl.} \cdot SST_{efl.} \quad \text{Equação 15}$$

Em que:

PS é a produção estimada diária de sólidos no reator em gSST d⁻¹

$Y_{biomassa}$ é o coeficiente de rendimento celular em gSST g⁻¹DQOaplicada;

$Q_{afl.}$ é a vazão afluenta do reator em L d⁻¹;

$DQO_{afl.}$ é a DQO afluenta em mg L⁻¹

AS é o arraste diário de sólidos do reator em gSST d⁻¹

$Q_{efl.}$ é a vazão efluente do reator em L d⁻¹

$SST_{efl.}$ é a concentração de sólidos em suspensão efluente do reator em gSST L⁻¹

$$COE = \frac{Q_{afl.} \cdot DQO_{afl.}}{SSV_{reator}} \quad \text{Equação 16}$$

$$TRC = \frac{SSV_{reator}}{Q_{efl.} \cdot SSV_{efl.}} \quad \text{Equação 17}$$

Em que:

COE é a carga orgânica específica em kgDQO kg⁻¹SSV d⁻¹

SSV_{reator} é a massa de sólidos suspensos voláteis presente no reator em gSSV;

TRC é o tempo de retenção celular ou idade do lodo em d;

SSV_{efl.} é a concentração de biomassa efluente do reator em gSSV L⁻¹

4.9. Ensaios de sorção

Visando elucidar os mecanismos envolvidos na remoção dos antibióticos nos reatores anaeróbios de leito fixo com espuma de poliuretano foram conduzidos ensaios de adsorção. A finalidade destes ensaios consistiu em determinar a relevância do mecanismo de sorção dos antibióticos no material suporte e na biomassa frente à rota de biodegradação.

Para a realização dos ensaios adsorptivos, inicialmente foi montado, inoculado e operado um novo reator de leito empacotado, alimentado com o substrato descrito na seção 4.4 (esgoto lab-made) sem a adição de antibiótico. Ao atingir condições estáveis de operação (em torno de duas semanas), as espumas com biomassa imobilizada foram sacadas do reator e inativadas em azida sódica (NaN₃) a 20 g L⁻¹ por um período de 24 h. Após este período elas foram transferidas para os reatores diferenciais, com detalhes na Figura 30, e então procedeu-se a alimentação dos mesmos em fluxo ascendente durante 20 h com esgoto lab-made contendo antibiótico próximo à concentração empregada no reator. Este ensaio consistiu em um teste preliminar de adsorção para simular os efeitos adsorptivos nos biorreatores de leito fixo operados com alimentação contínua.

Figura 30 - Reator diferencial (a) e desenho esquemático das partes constituintes do mesmo (b)

Fonte: Adaptado de Ribeiro (2005).

Ao final da operação dos reatores RALFE e RALFO (após a Fase VII), foram conduzidos ensaios de adsorção na biomassa de cada leito nos diferentes pontos de amostragem a fim de estimar a sorção dos antibióticos ao longo do perfil espacial do reator, por meio do cálculo do coeficiente de sorção ($\log K_D$) conforme Equação 1. Pequenas frações de espuma inoculadas foram retiradas de cada ponto de amostragem dos reatores, lavadas com água destilada e a biomassa lavada foi então centrifugada. Sobre uma porção de 5 g dessa biomassa fresca triturada foi adicionado 8 mL de acetonitrila em tubos de 50 mL, que permaneceram sob agitação (125 rpm) em mesa agitadora durante 24 h na ausência de luz. Após este tempo, a amostra foi centrifugada e o extrato resultante foi então transferido para outro tubo, ficando refrigerado (4 °C) na ausência de luz. Sobre a biomassa remanescente no tubo, adicionou-se 8 mL de metanol, repetindo-se o procedimento acima. O extrato de metanol (MeOH) foi adicionado ao extrato de acetonitrila (ACN) para então passar por um processo de secagem com gás N₂. Ao final da secagem foi adicionado água ultrapura até um volume 20 mL, sendo então filtrado em membrana de 0,45 μm . O volume final de solvente nessa mistura deve ser de até 5 %. Portanto, neste caso, a secagem do extrato final (MeOH + ACN) resultou num volume final de aproximadamente 1 mL. A amostra filtrada seguiu o mesmo procedimento descrito em 4.5.1 para determinação de SMX e CIP.

4.10. Estudo dos possíveis produtos de degradação formados

A determinação e a possível quantificação dos produtos da degradação (PD) anaeróbia de SMX e CIP foi realizada em conjunto com o Laboratório de Cromatografia (CROMA) do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), sob orientação do Professor Álvaro José dos Santos Neto. O grupo de pesquisa tem conduzido estudos sobre detecção e quantificação de produtos intermediários na degradação biológica e físico-química de antibióticos.

Como um teste preliminar foram conduzidos ensaios em batelada para avaliação dos produtos intermediários da degradação anaeróbia de SMX e CIP em alta concentração (5 mg L^{-1}), a fim de facilitar sua detecção. Para esse ensaio foi utilizado biomassa imobilizada em espuma de poliuretano adaptada em reator anaeróbio sem aplicação de antibiótico no substrato de alimentação (descrito na seção 4.4).

Ao atingir condições estáveis de operação, as espumas com biomassa imobilizada foram retiradas do reator e transferidas para frascos do tipo Duran de 500 mL. Adicionou-se em cada frasco solução contendo esgoto lab-made - Torres (1992) adaptado (seção 4.4) - com os antibióticos na concentração de 5 mg L^{-1} , totalizando um volume reacional de 400 mL. Um frasco com biomassa inativada (NaN_3 20 g L^{-1} por 24 h) foi utilizado para cada antibiótico a fim de avaliar a sorção dos fármacos na biomassa. Também foi preparado um frasco controle sem antibiótico e um controle abiótico sem a biomassa para cada fármaco. Para que o substrato ficasse totalmente anaeróbio foi aplicado um fluxo de gás nitrogênio em cada frasco durante 20 minutos. Então, os frascos foram tampados e colocados sob agitação ao abrigo da luz em shaker a 125 rpm e 30°C .

Para o sulfametoxazol foi avaliado os produtos de degradação após 72 h, enquanto para a ciprofloxacina, as amostras foram retiradas após, 24, 48 e 72 h, de forma a identificar possíveis compostos intermediários. As amostras ao final de cada ensaio foram centrifugadas para separação da fase líquida e sólida, e o sobrenadante filtrado em membrana de $0,22 \mu\text{m}$. A biomassa aderida na espuma foi retirada por meio de lavagem com água destilada e agitação com pérolas de vidro em tubo tipo falcon. Parte da biomassa foi utilizada para a análise do teor de sólidos e parte foi armazenada em freezer para posterior extração com solventes (MeOH e ACN) e análise de sorção dos antibióticos, conforme descrito na seção 4.9.

A fase líquida das amostras foi pré-concentrada 400 vezes por meio de SPE manual em cartuchos HLB de 3 mL (Waters Oasis), que foram acondicionados com 3 mL de MeOH seguido de 3 mL de água ultrapura a pH 3 (ajustado com ácido fórmico 98 % v/v). Após o

carregamento da amostra, a eluição sequencial foi realizada utilizando 1 mL de MeOH, seguido de 1 mL de ACN basificada (NH_4OH a 5 % v/v), 1 mL de ACN pura, e 1 mL de ACN acidificada (ácido fórmico a 5 % v/v). O extrato resultante foi seco sob uma corrente de gás nitrogênio em evaporador automático (XCElVap Biotage) e depois reconstituído com 1 mL de uma solução de água ultrapura com 5 % (v/v) de ACN.

As amostras concentradas foram analisadas em um sistema LC-ESI-QqToF/MS compreendido por um HPLC Shimadzu série 20A Prominence e espectrômetro de massas Bruker Daltonics modelo micrOTOF-Q II, equipado com coluna Kinetex XB-C18 (100 mm x 2,1 mm; 2,6 μm) da Phenomenex. Como fase móvel utilizou-se água ultrapura com 0,1 % ácido fórmico (A) / acetonitrila com 0,1 % ácido fórmico (B) utilizando a seguinte programação de gradiente: 0-3 min, 5 % de B; 3-12 min, 5-60 % de B; 12-14 min, 60-95 % de B; 14-20 min, 95 % de B; 20-22 min, 95-5 % de B; 22-26 min, 5 % de B. A vazão utilizada foi de 0,25 mL min^{-1} e temperatura do forno foi de 40°C. A interface de acoplamento do cromatógrafo com o espectrômetro foi por electrospray em modo positivo. Os parâmetros utilizados para esse método foram: voltagem do capilar de 4,5 kV, temperatura de dessolvatação de 200 °C, vazão do gás de secagem a 8 L min^{-1} e pressão do nebulizador 4 bar, intervalo de massas (m/z) monitorado de 50 a 3000 Da, taxa de aquisição de espectros de 2 Hz no modo full MS.

Como tentativa de identificação dos produtos formados, foram realizados experimentos de MS/MS dos compostos encontrados em um analisador de massas híbrido, de resolução unitária e alta sensibilidade (espectrômetro de massas ABSciex QTRAP® 5500). O sistema LC-ESI-QTRAP/MS, constituído por um HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity, com uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 3.0 mm; 2.7 μm) foi operado nas mesmas condições cromatográficas do sistema QqToF. A fonte de íons foi operada no modo electrospray positivo, segundo os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 5,5 kV; temperatura de 650 °C, gás de colisão em médio; cortina de gás de 20 psi, gás de aquecimento (GS1) de 50 psi e gás de nebulização (GS2) de 50 psi. As análises foram realizadas no modo EPI (enhanced product ion) e modo SRM (selected reaction monitoring) com dwell time de 10 ms, declustering potential de 56 V, entrance potential de 10 V, collision energy de 25 V e exit potential de 10 V para todas as transições monitoradas. Na Figura 31 é apresentado um resumo do procedimento experimental adotado para a análise e identificação dos produtos de degradação de SMX e CIP nos reatores em batelada.

Figura 31 - Esquema do procedimento adotado para a identificação dos produtos de degradação de SMX e CIP no ensaio em batelada

Fonte: Autoria própria.

Para a identificação dos possíveis PDs formados a partir de SMX e CIP nos ensaios de degradação em batelada, foram comparados os espectros de massa resultantes das amostras com biomassa ativa com os sem biomassa. As amostras sem adição dos fármacos serviram como linha de base dos espectros de massa da matriz aquosa, de forma a descartar os compostos característicos da matriz. Com o auxílio do software Data Analysis (Bruker) foi possível comparar os cromatogramas de íon total das amostras degradadas com as amostras controle. Analisando os picos cromatográficos e os espectros de massas das amostras degradadas nas quais os picos não apareceram no controle nem na matriz, pôde-se determinar as massas dos possíveis PDs e estabelecer o padrão de fragmentação pelos espectros de MS/MS. Finalmente, com base no padrão de fragmentação dessas massas selecionadas foi possível propor estruturas moleculares para os compostos.

A partir dos espectros de massas e com as transições resultantes para os possíveis PDs foi possível monitorá-los nos reatores RALFE e RALFO, considerando as concentrações reais de operação. Para isso, os fragmentos que apresentaram maior intensidade de sinal analítico foram então selecionados para o desenvolvimento de um método SRM (selected reaction monitoring)

para o estudo das amostras do perfil espacial dos reatores. Para garantir um alto fator de concentração dos PDs, foi coletado um volume de aproximadamente 400 mL para cada ponto de amostragem lateral do reator. As amostras coletadas foram filtradas em membrana de 0,45 µm para então passar pelo procedimento de extração por SPE manual (conforme descrito anteriormente) e detecção dos PDs por LC-MS/MS. Neste caso foi empregado o espectrômetro de massas ABSciex QTRAP 5500 (ABSciex, Canadá), descrito na seção 4.5.1, uma vez que esse possui maior sensibilidade, podendo detectar massas de analitos em concentrações muito baixas.

4.11. Ensaios ecotoxicológicos

Essa etapa do projeto foi realizada no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), em colaboração com o Professor Juliano José Corbi, docente e pesquisador vinculado ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Para os ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos foram selecionados dois organismos-teste, *Allonais inaequalis* (Oligoqueta: *Naididae*) e *Chironomus sancticaroli* (Diptera: *Chironomidae*). Essas espécies foram selecionadas por serem de fácil criação em laboratório, além de sua ocorrência na região de São Carlos (SP) e arredores. Além disso, segundo Corbi, Gorni e Correa (2015) e Corbi et al. (2010), invertebrados aquáticos, como larvas de Diptera e oligoquetos, têm capacidade de bioacumulação, o que reforça o uso deles como bioindicadores.

O gênero *Chironomus sp.* possui quatro estágios distintos em seu ciclo de vida, sendo ovo, larva, pupa e adulto, conforme observado na Figura 32. Na Figura 33, observa-se uma imagem microscópica do *Allonais inaequalis*.

Figura 32 - Ciclo de vida do gênero *Chironomus* sp. A – massa ovígera, B - larvas, C - pupa (1 – recente empupamento e 2 – pupa madura) e D- adultos (fêmea à esquerda e macho à direita)

Fonte: Adaptado de Viveiros (2012).

Figura 33 - *Allonais inaequalis*

Fonte: Adaptado de Corbi, Gorni e Correa (2015)

O cultivo de *Chironomus sancticaroli* foi realizado em bandejas plásticas e o de *Allonais inaequalis* em frascos plásticos de 500 mL (Figura 34), contendo uma camada de sedimento esterilizado ao fundo (areia fina comum, lavada em água corrente, seca em estufa a 60 °C e levada à mufla por 4 horas a 560 °C) e água deionizada, sob fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro, e temperatura controlada entre 22 e 26 °C. Os recipientes são alimentados periodicamente (aproximadamente uma vez por semana) com ração para peixe triturada (tipo Tetramim).

Figura 34 - Cultivo dos organismos-teste – bandejas de *Chironomus sancticaroli* (a) e frascos de *Allonais inaequalis* (b)

Fonte: Autoria própria.

Inicialmente, foi realizado um ensaio agudo para a determinação da concentração letal média (CL₅₀) de SMX e CIP, a fim de avaliar a sensibilidade dos organismos-teste aos fármacos. Posteriormente, foram realizados ensaios agudos e crônicos com as amostras afluente e efluente dos reatores para a observação de efeitos sobre o desenvolvimento dos organismos.

Para a realização dos ensaios agudos com *Chironomus sancticaroli* foram selecionadas larvas do quarto ínstar. Já para os ensaios crônicos, foi separada uma desova e os organismos foram selecionados dentro de 24 a 48 h, tempo suficiente para as larvas eclodirem. A seleção dos organismos e observação dos mesmos ao final do teste foi feita com auxílio de um estereomicroscópio com base LED (SMZ 445 Nikon). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra. Na Figura 35 podem ser observados os organismos usados no ensaio de toxicidade aguda.

Figura 35 - Organismos-teste utilizados nos ensaios agudos observados com estereomicroscópio - *Chironomus sancticaroli* (a) e *Allonais inaequalis* (b)

Fonte: Autoria própria.

Os testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados em frascos plásticos de 500 mL. Em cada frasco adicionou-se 240 mL de amostra, 5 mL de solução de alimento (ração para peixe Tetramim diluído em água – 2 g L^{-1}) e 6 organismos-teste. Para o teste agudo de sensibilidade foram selecionadas as seguintes concentrações de SMX e CIP - 1 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} . Os frascos foram mantidos em fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro, e temperatura controlada entre 22 e 26 °C, durante 96 horas. Após este período os organismos foram contabilizados para verificar a mortalidade. Um ensaio controle em triplicata foi realizado utilizando água destilada, solução alimento e 6 organismos-teste, sem a adição do antibiótico. A taxa de sobrevivência (%) foi calculada a partir do número de organismos vivos e não vivos, sendo realizada comparação com o ensaio controle. Para os ensaios agudos com as amostras afluentes e efluentes dos reatores o procedimento foi o mesmo.

Para os ensaios crônicos com as amostras dos reatores, procedeu-se da mesma forma, exceto que o tempo de exposição empregado foi de 10 dias ou mais sob aeração constante nos frascos, para que a falta de oxigenação nas amostras não prejudicasse o desenvolvimento dos organismos. Na Figura 36 observam-se os frascos montados para execução dos ensaios, com detalhe para o esquema de aeração nos recipientes utilizados nos ensaios crônicos.

Figura 36 - Frascos usados na preparação dos ensaios agudos e crônicos (a); detalhe para aeração nos frascos utilizados nos ensaios crônicos (b)

Fonte: Autoria própria.

4.12. Ensaios de atividade antimicrobiana

A fim de avaliar a atividade antimicrobiana das amostras afluentes e efluentes dos reatores anaeróbios foram conduzidos ensaios de exposição de microrganismos, tipicamente encontrados no tratamento biológico, aos antibióticos SMX e CIP. Para esses ensaios foram selecionados e adaptados dois tipos de testes frequentemente utilizados em microbiologia

clínica para verificação da sensibilidade a antimicrobianos – teste de macrodiluição em tubos e teste de disco-difusão.

Como ensaio preliminar foi selecionado a *Escherichia coli*. A cepa selecionada de *E. coli* (*E. Coli* DHS α) foi retirada do freezer a -80 °C e colocada em substrato específico para aclimatização e crescimento. O substrato selecionado é o substrato LB (Luria-Bertani) composto de 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl. Após dissolvidos os reagentes, ajustou-se o pH para 7 e foi feita a autoclavagem do meio. Foi retirada uma alíquota de 100 μ L da cultura mãe de *E. coli* e transferido para tubos contendo 5 mL de substrato LB. Após verificado o crescimento da cultura, foram retiradas alíquotas de 100 μ L desses tubos e transferidos para outros tubos contendo 5 mL de LB (diluição de $4 \cdot 10^{-4}$ da cultura mãe). Nesses tubos foram adicionadas soluções padrão de SMX e CIP para as seguintes concentrações: 400 ng L⁻¹ (concentração aplicada nos reatores RALFE e RALFO), 2 μ g L⁻¹, 200 μ g L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹. Foi preparado uma amostra em branco somente com LB e *E. coli* e um controle negativo com o antibiótico ampicilina, uma vez que a *E. coli* é sensível a este composto. Então procedeu-se a incubação dos tubos a 37 °C e após 24 h foi analisado o crescimento da cultura por meio da densidade óptica em espectrofotômetro (absorbância $\lambda = 600$ nm).

Um segundo teste foi realizado a fim de verificar a atividade antimicrobiana dos antibióticos SMX e CIP sobre bactérias ambientais presentes em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias. As bactérias selecionadas para esse ensaio foram *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* e *Escherichia coli*. Inicialmente elas foram retiradas do freezer a -80 °C e colocadas em caldo nutriente para aclimatização e crescimento. Após crescimento em caldo nutriente, elas foram colocadas em esgoto lab-made – meio Torres (1992) adaptado (conforme descrito na seção 4.4). O esgoto lab-made preparado foi filtrado em 0,22 μ m e autoclavado. Verificado crescimento positivo no substrato lab-made, elas foram transferidas para tubos contendo o substrato (diluição de $4 \cdot 10^{-5}$ da cultura mãe) com os antibióticos SMX e CIP nas seguintes concentrações: 400 ng L⁻¹ (concentração aplicada nos reatores RALFE e RALFO), 200 μ g L⁻¹, 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹. Um branco sem antibiótico foi preparado para cada bactéria testada. Foi avaliado o crescimento dos microrganismos por meio da densidade óptica ($\lambda = 600$ nm) após 24, 48, 68, 160 e 190 h de incubação a 30 °C. Essa temperatura foi adotada por ser a temperatura de operação dos reatores. Como amostra zero do espectrofotômetro foi utilizado o próprio esgoto lab-made filtrado em 0,22 μ m. Um esquema do procedimento adotado para esse ensaio é apresentado na Figura 37.

Figura 37 - Procedimento do ensaio de atividade antimicrobiana de SMX e CIP na amostra afluenta dos reatores sobre os microrganismos *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* e *Escherichia coli*.

Fonte: Autoria própria.

Para as amostras de efluente dos reatores foi adaptado o teste de disco-difusão (método de Kirby-Bauer) em placas de petri de 150 mm de diâmetro. Sobre cada placa foi colocado 20 mL de caldo nutriente em ágar. Após solidificado foram adicionados os inóculos de *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* e *Escherichia coli* por estriamento. Então, procedeu-se a aplicação de oito discos em cada placa de maneira aproximadamente uniforme. Os discos consistiram em papeis de filtro qualitativo de porosidade igual a 3 µm, diâmetro de 8 mm e densidade de 80 g m⁻² (Nalgon Equipamentos Científicos, Itupeva, SP, Brasil). Sobre os discos porosos foi pipetado uma alíquota de 5 µL das amostras efluente dos reatores fortificadas com fármacos a serem testadas. Foram selecionadas as seguintes amostras: esgoto lab-made do RALFE em concentração de SMX e CIP de 100 ng L⁻¹ aproximadamente; efluente do RALFE alimentado com esgoto doméstico em concentração de SMX e CIP de 200 ng L⁻¹ aproximadamente; esgoto lab-made do RALFE fortificado com concentração de 5 mg L⁻¹ de SMX e esgoto lab-made do RALFE fortificado com concentração de 5 mg L⁻¹ de CIP. Para o ensaio controle foi aplicada amostra de esgoto lab-made do RALFE sem antibiótico. Na Figura 38 pode-se observar a preparação das placas com a adição das amostras-teste sobre os discos. Finalmente, as placas foram incubadas a 30 °C e após 48 horas foi avaliado a presença dos halos de inibição nas amostras. Quanto maior o diâmetro do halo, maior a inibição antimicrobiana das amostras testadas.

Figura 38 - Preparo das placas de petri para o ensaio de atividade antimicrobiana de SMX e CIP na amostra efluente dos reatores sobre os microrganismos *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* e *Escherichia coli*

Fonte: Autoria própria.

4.13. Avaliação da influência da hidrólise e acidogênese na remoção de micropoluentes orgânicos

Esta etapa da pesquisa foi realizada durante um período de dez meses referente ao doutorado sanduíche no Grupo de Biotecnologia Ambiental (Biogroup), do Departamento de Engenharia Química, da Universidade de Santiago de Compostela (Espanha). O objetivo principal da investigação desenvolvida no Biogroup foi determinar como cada etapa da digestão anaeróbia, mais especificamente a hidrólise e a acidogênese, influenciava na remoção do sulfametoxazol e ciprofloxacina. No entanto, devido ao pouco tempo hábil para finalizar o projeto não foi possível desenvolver um método analítico para CIP, considerando que para SMX o método já estava validado no laboratório. Como fazia parte da rotina de análises do grupo de pesquisa a avaliação de uma série de micropoluentes orgânicos (MPOs), foi adicionado a esta etapa outros compostos, abrangendo várias classes de fármacos e produtos de cuidado pessoal (detalhados na seção 4.13.2.), o que ampliou o conhecimento a respeito da degradação de MPOs em sistemas anaeróbios e possibilitou o aprendizado de novas técnicas analíticas, conforme descrito nas seções seguintes.

4.13.1. Reator hidrolítico / acidogênico e condições operacionais

Para este estudo foi empregado um reator anaeróbio de mistura completa (CSTR – continuous stirred-tank reactor) de 5 L de volume útil operado sob condição mesofílica (37 °C). De forma a inibir a metanogênese, o reator foi mantido em condições ácidas, sendo o pH controlado na faixa de $5,0 \pm 0,2$ por meio da dosagem de hidróxido de sódio (NaOH 1,0 mol L⁻¹) e ácido clorídrico (HCl 0,1 mol L⁻¹) por bombas dosadoras conectadas a uma sonda de

monitoramento online de pH. A inibição da metanogênese foi confirmada pela ausência de metano no biogás. Na Figura 39 pode-se visualizar o aparato experimental do reator.

O reator foi inoculado com lodo de um digestor anaeróbio mesofílico da ETE de Santiago de Compostela (Espanha). Ele foi operado de forma semi-contínua, procedendo-se a retirada de efluente e alimentação uma vez por dia, num volume de 1,25 L (25 %). De forma a manter a concentração de biomassa dentro do reator, foi adotado um tempo de sedimentação de 15 minutos antes da retirada do efluente. A carga orgânica volumétrica aplicada foi fixada durante todo o período operacional em $3,1 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e o tempo de detenção hidráulica (TDH) foi de 4 d.

Figura 39 - Aparato experimental do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Para a composição do substrato optou-se por trabalhar com carboidratos como substrato principal, uma vez que eles são de fácil assimilação pelas bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio, tais como *Clostridium sp.* (KIM; HAN; SHIN, 2004); são rapidamente e mais eficientemente degradados do que as proteínas durante a digestão anaeróbia (YANG et al., 2015); e tem-se ainda que as rotas metabólicas dos carboidratos são bem conhecidas, sendo a glicólise a rota obrigatória para a formação de piruvato com a geração sequencial dos produtos solúveis da fermentação (TEMUDO; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007). Dessa forma, dividiu-se a operação do reator em duas fases – a primeira utilizando um carboidrato complexo (amido de batata) como substrato principal a fim de estudar o efeito combinado da hidrólise e acidogênese sobre a eliminação de MPOs; e a segunda, utilizando um carboidrato

simples (monossacarídeo glicose), eliminando, assim, a etapa hidrolítica, de forma a estabelecer a contribuição somente da acidogênese no processo.

Além da fonte de carbono (12,5 gDQO L⁻¹ de amido ou glicose), o substrato lab-made foi composto por macronutrientes (em mg L⁻¹) - NH₄Cl (572), KH₂PO₄ (416), CaCl₂ (8), MgCl₂.6H₂O (96); e micronutrientes (in µg L⁻¹) - FeCl₂.4H₂O (1987), CoCl₂.6H₂O (2378), MnCl₂.4H₂O (593), CuCl₂.2H₂O (34), H₃BO₃ (62), Na₂MoO₄.2H₂O (73), Na₂SeO₃ (69), NiCl₂.6H₂O (95), ZnCl₂ (55), baseado em Angelidaki e Sanders (2004).

4.13.2. Micropoluentes orgânicos (MPOs) selecionados para o estudo

Foram selecionados para este estudo 21 MPOs frequentemente encontrados nas águas residuárias domésticas e lodos de ETE, compreendendo compostos com uma grande variedade de aplicações (Tabela 12) - quatro antibióticos: sulfametoxazol (SMX), trimetoprim (TMP), eritromicina (ERY) e roxitromicina (ROX); três fragrâncias sintéticas: galaxolide (HHCB), tonalide (AHTN) e celestolide (ADBI); três anti-inflamatórios: ibuprofeno (IBP), naproxeno (NPX) e diclofenaco (DCF); quatro fármacos psicoativos: fluoxetina (FLX), carbamazepina (CBZ), diazepam (DZP) e citalopram (CTL); dois surfactantes: 4-octilfenol (OP) e 4-nonilfenol (NP); três estrogênios: estrona (E1), 17β-estradiol (E2) e 17α-etinilestradiol (EE2); um plastificante: bisfenol-A (BPA); e o antisséptico triclosan (TCS). As concentrações aplicadas no substrato de alimentação lab-made foram baseadas em Clara et al. (2011), Verlicchi, Aukidy e Zambello (2012), e Tran, Reinhard e Gin (2018), e foram as seguintes: 1 µg L⁻¹ para estrogênios; 40 µg L⁻¹ para fragrâncias, 20 µg L⁻¹ para surfactantes, BPA e TCS; e 10 µg L⁻¹ para os demais MPOs.

Tabela 12 - Aplicações, fórmula e estrutura molecular dos micropoluentes orgânicos monitorados na operação do reator hidrolítico / acidogênico

MPO (Fórmula Molecular)	Aplicação	Estrutura molecular
Sulfametoxazol (SMX) (C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)	Antibiótico	
Trimetoprim (TMP) (C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃)	Antibiótico	
Eritromicina (ERY) (C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃)	Antibiótico	
Roxitromicina (ROX) (C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅)	Antibiótico	
Galaxolide (HHCB) (C ₁₈ H ₂₆ O)	Fragrância Sintética	
Tonalide (AHTN) (C ₁₈ H ₂₆ O)	Fragrância Sintética	
Celestolide (ADBI) (C ₁₇ H ₂₄ O)	Fragrância Sintética	
Ibuprofeno (IBP) (C ₁₃ H ₁₈ O ₂)	Anti-inflamatório	
Naproxeno (NPX) (C ₁₄ H ₁₄ O ₃)	Anti-inflamatório	
Diclofenaco (DCF) (C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂)	Anti-inflamatório	
Fluoxetina (FLX) (C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO)	Fármaco psicoativo	
Carbamazepina (CBZ) (C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O)	Fármaco psicoativo	
Diazepam (DZP) (C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O)	Fármaco psicoativo	

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 (continuação) - Aplicações, fórmula e estrutura molecular dos micropoluentes orgânicos monitorados na operação do reator hidrolítico / acidogênico

MPO (Fórmula Molecular)	Aplicação	Estrutura molecular
Citalopram (CTL) (C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O)	Fármaco psicoativo	
Bisfenol-A (BPA) (C ₁₅ H ₁₆ O ₂)	Plastificante	
Triclosan (TCS) (C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂)	Antisséptico	
Octilfenol (OP) (C ₁₄ H ₂₂ O)	Surfactante	
Nonilfenol (NP) (C ₁₅ H ₂₄ O)	Surfactante	
Estrona (E1) (C ₁₈ H ₂₂ O ₂)	Estrogênio	
17β-estradiol (E2) (C ₁₈ H ₂₄ O ₂)	Estrogênio	
17α-ethinilestradiol (EE2) (C ₂₀ H ₂₄ O ₂)	Estrogênio	

Fonte: Autoria própria.

4.13.3. Métodos analíticos

O monitoramento da performance de acidificação do reator foi realizado por meio da análise de ácidos graxos voláteis (AGV - acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, capríco, isocapríco e heptanóico) no efluente do reator com frequência de duas a três vezes por semana utilizando cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC/FID - HP 7637A). O teor de sólidos (suspensos, voláteis, dissolvidos e fixos) e de matéria orgânica em termos de DQO foi medido no efluente e no interior do reator semanalmente e a DQO afluente foi medida na solução de alimentação eventualmente para confirmar a DQO teórica e fechamento do balanço de massa. Análises pontuais de glicose, etanol e ácido fórmico no efluente foram realizadas por cromatografia líquida (HPLC Agilent 1100). O pH do reator foi monitorado continuamente por uma sonda CRISON pH 28. Amostras de biogás foram ocasionalmente analisadas referente à sua composição em termos de CH₄ e CO₂ por cromatografia gasosa (HP 5890 Series II).

Para a avaliação da performance do reator na eliminação de MPOs foram feitas seis campanhas de amostragem, considerando as amostras afluente, efluente e na biomassa do reator, sendo três campanhas em duplicata ($n = 6$) durante a etapa hidrolítica / acidogênica e três campanhas em triplicata ($n = 9$) durante a etapa acidogênica. As amostragens foram feitas em dias diferentes, sendo o reator operado sob estado estacionário e boa performance de acidificação ($> 50 \%$).

As amostras afluente e efluente foram filtradas para um volume de 250 mL para então passar pelo processo de extração em fase sólida (SPE) em cartuchos HLB (OASIS - Waters, Milford, MA, USA). Para a biomassa foi realizado previamente sua liofilização de forma a obter 0,5 g aproximadamente de massa seca, que passou por um procedimento de extração em ultrassom com solventes (Ultrasonic solvent extraction - USE). O processo consistia em uma extração sequencial com os solventes metanol e acetona. Primeiramente adicionava-se sobre a biomassa seca 4 mL de metanol em tubos de vidro que eram ultrassonicados por 15 min e então centrifugados a 1500 rpm durante 5 min. O sobrenadante era recolhido e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4°C). O processo foi repetido mais 4 vezes com 4 mL de metanol, 2 mL de metanol, 4 mL de acetona e 2 mL de acetona, resultando num extrato final de 16 mL que foi passado por lã de vidro para reter partículas grosseiras, e, então, seco por uma corrente de gás N_2 , e reconstituído em 100 mL de água ultrapura. Essa amostra foi concentrada por SPE em cartuchos HLB da mesma forma que para as amostras da fase líquida. Ressalta-se que as amostras que passaram por GC/MS foram ajustadas para pH de 2,5 antes do procedimento de SPE. Na Figura 40 é apresentado um desenho esquemático do procedimento de USE-SPE-GC/LC-MS/MS adotado para detecção dos MPOs na biomassa.

Os compostos IBP, NPX, DCF, BPA, TCS, NP, OP, HHCB, AHTN e ADBI foram determinados por um cromatógrafo a gás (Varian CP-3900) acoplado a um espectrômetro de massas ion trap (Varian CG-2100). Já os compostos FLX, CBZ, DZP, CTL, ERY, ROX, SMX, TMP, E1, E2, EE2 foram determinados por cromatógrafo a líquido (Agilent G1312A) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (API 4000 Applied Biosystems).

Figura 40 - Esquema do procedimento de extração de MPOs da fase sólida por ultrassom com solventes e posterior concentração em SPE e detecção por GC / LC – MS/MS

Fonte: Autoria própria.

Para os compostos analisados por GC/MS, o condicionamento dos cartuchos de SPE (volume útil de 3 mL) foi feito sequencialmente com 3 mL de acetato de etila, 3 mL de metanol (MeOH) e 3 mL de água destilada (pH 2,5); e a eluição foi realizada com 3 mL de acetato de etila. Já para os compostos analisados por LC/MS, o condicionamento dos cartuchos foi feito com 3 mL de MTBE (éter metil terciário butílico), 3 mL de metanol e 3 mL de água destilada; e a eluição foi feita com 1,5 mL da mistura MTBE:MeOH (90:10 % v/v), e 1,5 mL de MeOH.

4.13.4. Balanço de massa de DQO e desempenho de acidificação do reator

O balanço de massa do reator em termos de matéria orgânica ($gDQO\ d^{-1}$) foi realizado segundo a Equação 18, de forma a determinar a distribuição em massa da DQO de entrada utilizada para crescimento da biomassa e convertida em biohidrogênio e produtos solúveis da fermentação (AGV, etanol, ácido fórmico, entre outros). A biomassa gerada no reator por anabolismo foi considerada equivalente à biomassa que era lavada do reator continuamente pela corrente efluente, uma vez que o teor de SSV no reator manteve-se aproximadamente constante

em cada fase operacional. A eficiência de acidificação (%) do reator também foi determinada baseado na relação entre DQO equivalente efluente de AGV gerada no reator e a DQO da alimentação (Equação 19).

$$Q_{afl.} \cdot DQO_{afl.} = Q_{efl.} \cdot (DQO_{AGV} + DQO_{PSF} + DQO_{SSV}) + Q_{gas} DQO_{H2} \quad \text{Equação 18}$$

$$\text{Acidificação (\%)} = \frac{DQO_{AGV}}{DQO_{afl.}} \cdot 100 \quad \text{Equação 19}$$

Em que:

$Q_{afl.}$ é a vazão de alimentação do reator (em L d⁻¹);

$Q_{efl.}$ é a vazão efluente do reator (em L d⁻¹);

$Q_{gas.}$ é a vazão da corrente de gás (em L d⁻¹);

$DQO_{afl.}$ é a DQO da alimentação do reator (em gDQO L⁻¹);

DQO_{AGV} é a DQO efluente equivalente total de AGV (em gDQO L⁻¹);

DQO_{PSF} é a DQO efluente referente a outros produtos solúveis da fermentação, como etanol, ácido fórmico e demais intermediários não contabilizados (em gDQO L⁻¹);

DQO_{SSV} é a DQO efluente equivalente a biomassa (em gDQO L⁻¹) baseado no coeficiente de rendimento celular ($Y_{DQO/SSV}$), calculado experimentalmente conforme explicitado na Tabela 35;

DQO_{H2} é a DQO correspondente à corrente gasosa (em gDQO L⁻¹), composta por biohidrogênio, desconsiderando a presença de sulfeto e metano, que não foram detectados.

4.13.5. Balanço de massa de MPOs, parâmetros de sorção e biotransformação

Os mecanismos preponderantes envolvidos na eliminação total dos MPOs compreendem a sorção e a biotransformação. Assumindo que o reator se comportou como mistura completa (CSTR), a remoção de cada MPO pode ser calculada pela diferença de concentração na fase líquida entre a entrada e saída do reator (Equação 20), uma vez que as vazões de entrada e saída são iguais e não ocorre eliminação por volatilização. Portanto, para determinar a remoção somente devido à biotransformação (Equação 21), a parcela de sorção deve ser desconsiderada (C_{sor} , Equação 22). A contribuição da sorção para a remoção total pode ser calculada pela Equação 23. Uma vez o reator estava sob estado estacionário, sendo a biomassa gerada no reator

equivalente à biomassa lavada do sistema, a contribuição da sorção na eliminação total foi considerada devida a parcela de SST efluente do reator.

$$\begin{aligned} \text{Remoção total (\%)} &= \frac{C_{afl.} - C_{efl.}}{C_{afl.}} \cdot 100 \\ &= \text{biotransformação (\%)} + \text{sorção (\%)} \end{aligned} \quad \text{Equação 20}$$

$$\text{Biotransformação (\%)} = \frac{C_{afl.} - (C_{efl.} + C_{sor})}{C_{afl.}} \cdot 100 \quad \text{Equação 21}$$

$$C_{sor} = C_x \cdot SST_{efl.} \quad \text{Equação 22}$$

$$\text{Sorção (\%)} = \frac{C_{sor}}{C_{afl.}} \cdot 100 \quad \text{Equação 23}$$

Em que:

$C_{afl.}$ é a concentração de MPO na corrente de alimentação do reator (em $\mu\text{g L}^{-1}$);

$C_{efl.}$ é a concentração de MPO efluente na fase líquida (em $\mu\text{g L}^{-1}$);

$C_{sor.}$ é a concentração de MPO efluente na fase sólida (em $\mu\text{g L}^{-1}$);

C_x é a concentração de MPO sorvida na biomassa do reator (em $\mu\text{g g}^{-1}\text{SST}$);

$SST_{efl.}$ é a concentração de sólidos suspensos totais efluente (em gSST L^{-1});

Além desses parâmetros, a constante de biodegradação de pseudo-primeira ordem (k_{bio} em $\text{L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) foi calculada, baseada na Equação 2 apresentada anteriormente, resultando na Equação 24. Além disso, a relevância do mecanismo de sorção na biomassa também foi estimada pelo coeficiente de partição ($\log K_D$ – Equação 1)

$$k_{biol} = \frac{\ln\left(\frac{C_{afl.}}{C_{efl.}}\right)}{SSV_x \cdot TDH} \quad \text{Equação 24}$$

Em que:

SSV_x é a concentração de sólidos suspensos voláteis da biomassa (em $gSSV L^{-1}$).

4.13.6. Influência do pH na eliminação de MPOs

Partindo do pressuposto que o pH pode influenciar a eliminação de vários MPOs, como por exemplo, os antibióticos, que apresentam alto grau de especiação, de acordo com o pH do substrato (Figuras 4 e 8), foram realizados testes em batelada para avaliar o efeito do pH sobre a remoção dos MPOs avaliados neste estudo.

Primeiramente, foram conduzidos testes abióticos (sem biomassa) a pH 5 e 7 em triplicata nas concentrações de MPOs equivalentes às aplicadas no reator contínuo. Os frascos foram mantidos sob agitação (150 rpm) a 37 °C por 72 h. Nesse ensaio preliminar foi possível verificar uma diminuição significativa somente nas concentrações dos antibióticos macrolídeos (ERY e ROX) a pH 5, o que não ocorreu em pH 7.

Para corroborar e estimar a eliminação de macrolídeos por biotransformação e remoção abiótica pelo efeito do pH no biorreator, ensaios bióticos (com biomassa) foram conduzidos a pH 5 e 7 em triplicata tomando a biomassa do reator contínuo em operação ($4,8 gSSV L^{-1}$) e o substrato lab-made (descrito na seção 4.13.1) com $10 gDQO L^{-1}$ (como amido), acrescido de $10 \mu g L^{-1}$ de ERY, ROX e CBZ (esta utilizada como controle negativo). A fim de manter o pH durante o ensaio foi utilizado $KHCO_3$ na razão de $1,2 g KHCO_3 g^{-1}DQO$. Os frascos foram mantidos sob agitação (150 rpm) a 37 °C por 96 h. Para inibição da metanogênese, foi adicionado $20 mmol L^{-1}$ de BES (2-Bromoetanosulfonado) conforme Silva et al. (2013). A composição do biogás foi monitorada uma vez por dia, e a presença de metano não foi detectada. Tanto no ensaio abiótico, quanto no biótico, a concentração de MPOs foi analisada no período inicial e após o período de incubação, seguindo o procedimento detalhado na seção 4.13.3. Na Figura 41 pode-se visualizar um esquema do procedimento do ensaio biótico realizado.

Figura 41 - Desenho esquemático do ensaio biótico em batelada para avaliação do efeito do pH sobre a remoção dos MPOs

Fonte: Autoria própria.

4.13.7. Influência da atividade enzimática na eliminação de MPOs

A fim de determinar a influência das enzimas hidrolíticas e acidogênicas sobre a eliminação dos MPOs, primeiramente tentou-se medir a atividade enzimática presente no reator. Para a fase hidrolítica / acidogênica com amido como substrato foram consideradas a alfa-amilase e a glucoamilase como enzimas de interesse na hidrólise. Para a fase acidogênica – fermentação da glicose – foi selecionada a enzima hexoquinase, uma vez que é a primeira enzima atuante no processo de glicólise, rota obrigatória de oxidação da glicose até piruvato, antes deste ser convertido a AGV e outros produtos solúveis da fermentação.

Para a extração das enzimas do reator, foi realizado um método de pré-tratamento da biomassa proposto por Krah et al. (2016). Uma amostra da biomassa do reator foi centrifugada a 3500 G por 6 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi reservado para análise das enzimas extracelulares presentes. O pellet resultante foi reconstituído em tampão Tris-HCl (50 mmol L⁻¹, pH 7,4), sendo a biomassa concentrada aproximadamente três vezes. Um volume de 25 mL da suspensão foi ultrassonicado para ruptura das células microbianas. A lise celular foi realizada em banho de gelo com a haste do ultrassom imersa na amostra, a menos de 1 cm da superfície, sendo aplicado densidade de potência de 1 W mL⁻¹, durante 20 minutos, em intervalos de 15 segundos a fim de evitar superaquecimento da amostra. O lodo, após passar pelo processo de sonicação, foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido - lisado celular - foi filtrado em membrana de fibra de vidro (0,45 µm).

Dois métodos de concentração das enzimas presentes no reator também foram adotados, tomando-se a biomassa liofilizada e reconstituída em tampão citrato-fosfato (pH 4,8), e procedendo-se a filtração em uma coluna de dessalinização PD10 (Figura 42a), e ultrafiltração em membrana de 3 kDa (Figura 42b). A concentração de proteína das amostras foi determinada em duplicata usando o método BCA (*bicinchoninic acid*) por meio do kit de quantificação de proteínas (Interchim Uptima).

Figura 42 - Métodos para concentração das enzimas do lisado celular – coluna de dessalinização PD10 (a) e membrana de ultrafiltração (b).

Fonte: Autoria própria.

Para a determinação da atividade enzimática da alfa-amilase, as amostras (sobrenadante e lisado celular) foram incubadas por 30 segundos a 37 °C e então adicionou-se o reagente de trabalho do kit Spinreact (Ref. ID SP41201), contendo 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNPG₃). Neste método a alfa-amilase hidrolisa o CNPG₃ para liberar 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) e formar 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltoside (CNPG₂), maltotriose (G₃) e glicose (G) de acordo com a seguinte reação:

Após homogeneização da amostra, a absorbância foi lida a 405 nm em intervalos de 1 min. Por meio do gradiente de absorbância, foi possível calcular a atividade enzimática da alfa-amilase em U L⁻¹ em que 1 U corresponde a 1 μ mol de 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) sendo gerado por minuto.

Para medir a atividade enzimática da glucoamilase, 0,2 mL de amostra foi incubado por 1 h a 35 °C com 0,2 mL de uma solução de amido 4 % em tampão citrato-fosfato. A reação enzimática foi interrompida por fervura das amostras (imersão em banho a 100 °C) durante 2 minutos. Então, o reagente de trabalho do kit da Spinreact (Ref. 41011) para determinação quantitativa de glicose foi adicionado. Após homogeneização da mistura, a absorbância (Abs) foi lida a 505 nm e seu gradiente foi determinado considerando um tempo de reação de 20 min. Finalmente, a atividade enzimática foi determinada de acordo com a Equação 25. Um padrão de glicose de 1 g L⁻¹ e um branco correspondente ao reagente de trabalho foi usado para o cálculo da atividade enzimática. O resultado da equação também pode ser expresso em U.L⁻¹, em que 1 U corresponde a 1 µmol de glicose sendo gerada por minuto.

$$\text{Atividade glucoamilase (g glicose L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \frac{Abs_{20min} - Abs_{0min}}{Abs_{padr\tilde{a}o} - Abs_{branco}} \quad \text{Equação 25}$$

Para a medida da atividade enzimática da hexoquinase foi utilizado um kit da Abcam (AB136957). O princípio do método é expresso de acordo com a Figura 43. Uma unidade de hexoquinase corresponde a quantidade de enzima para gerar 1 µmol de NADH por minuto a pH 8 em temperatura ambiente.

Figura 43 - Representação esquemática do ensaio para medição da atividade enzimática da hexoquinase.

Fonte: Adaptado de Abcam

O procedimento foi realizado em microplaca de 96 poços. Primeiramente, uma curva analítica foi preparada para medição de NADH de 0 a 12 nmol (Figura 44). As amostras foram diluídas em tampão, fornecido pelo fabricante, para um volume de 50 µL. Então, sobre cada amostra, incluindo os padrões e o lisado celular, adicionou-se 50 µL de reagente misto, preparado segundo as instruções do fabricante. A placa foi incubada a temperatura ambiente (25 °C) por 1 h e a absorbância (450 nm) foi medida no modo cinético a cada 2 min por meio

de leitor de microplacas BioTek Synergy 2 plate reader (BioTek Instruments Inc., USA). A inclinação da curva NADH / min foi obtida para obter a atividade enzimática da hexoquinase.

Figura 44 - Curva analítica para determinação da atividade enzimática da hexoquinase

Fonte: Autoria própria.

A fim de avaliar a influência efetiva da enzima hexoquinase sobre a biotransformação dos MPOs foi realizado testes in vitru aplicando a enzima comercial hexoquinase proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich – H4502). Os ensaios in vitru foram preparados em frascos âmbar de 30 mL para um volume reacional de 25 mL. O meio reacional foi composto de glicose (5,6 mmol L⁻¹), hexoquinase (100 mmol L⁻¹), tampão trietanolamina (39 mmol L⁻¹), ATP (8 mmol L⁻¹) e magnésio (7,8 mmol L⁻¹ de Mg²⁺ na forma de MgCl₂). Os MPOs foram adicionados na concentração de 10 µg L⁻¹ para estrogênios e 100 µg L⁻¹ para os demais. O pH do meio foi ajustado para 7,5. Frascos sem enzima foram preparados como amostras controle. O ensaio foi conduzido em triplicata. Os frascos foram incubados a 30 °C em shaker sob agitação (125 rpm) durante 24 h. Para manter a atividade enzimática foram adicionados pulsos horários de hexoquinase e ATP até atingir concentração nula de glicose no meio, que se deu a partir das 5 horas de ensaio. Nos frascos controle foram adicionados concomitantemente pulsos de ATP e tampão trietanolamina. Após 24 horas, as amostras de cada frasco juntamente com as amostras do tempo inicial foram separadas em alíquotas de 10 mL para análise por GC/MS e 10 mL para LC/MS, sendo as de GC/MS ajustadas em pH 2,5. O procedimento analítico dos MPOs seguiu conforme descrito na seção 4.13.3, sendo neste caso utilizado cartuchos de extração de 1 mL, e os volumes de condicionamento e eluição todos alterados, portanto, para 1 mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaios hidrodinâmicos dos reatores

A Figura 45 apresenta as curvas-resposta ao estímulo degrau nas duas configurações de reatores testadas – RALFE e RALFO. As curvas adimensionais de distribuição do tempo de residência (Curva E_θ) foram normalizadas por ajuste LogNormal com o auxílio do software OriginPro 8.6.

Figura 45 - Resposta ao estímulo degrau nos reatores de leito fixo livres de biomassa - Curva F no RALFE (a) e no RALFO (b) e curva E_θ no RALFE (c) e no RALFO (d)

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Pode-se observar pela curva E_θ que em ambos os reatores o TDH teórico esperado coincidiu com o TDH real obtido pelo ensaio hidrodinâmico (valores indicados na Tabela 13), o que indica a inexistência de anomalias no padrão de escoamento dessas configurações de reatores com espuma de poliuretano sem a presença de biofilme. Anzola-Rojas e Zaiat (2016) também observaram este comportamento em reator de leito ordenado com espuma de poliuretano e fluxo descendente. Entretanto, usando cerâmica e polietileno de baixa densidade como material suporte foram constatados maiores desvios do TDH real comparando-se ao TDH teórico.

Pelos resultados encontrados para o número de dispersão (D/uL) do modelo de dispersão longitudinal aplicado (Tabela 13), pode-se inferir que o padrão de escoamento nos reatores se aproximou mais do plug-flow (pistonado ideal), uma vez que os valores calculados tendem a zero. De acordo com Levenspiel (1999), para valores de D/uL menores que 0,01, os modelos apresentam baixa dispersão do reator pistonado ideal.

Tabela 13 - Resultados do ensaio hidrodinâmico e parâmetros do modelo de dispersão longitudinal nos reatores

Reator	TDH teórico de 4 h		TDH teórico de 12 h	
	TDH Real	D/uL	TDH Real	D/uL
RALFE	4,2	0,00351	12,2	0,00353
RALFO	4,1	0,00227	12,0	0,00268

Fonte: Autoria própria.

5.2. Avaliação do desempenho dos reatores em TDH de 12 h

5.2.1. Remoção de DQO, SMX e CIP

A Figura 46 apresenta os gráficos da variação temporal de DQO nos dois reatores para as fases operacionais de I a IV (TDH = 12 h). Pode-se observar o rápido período de adaptação da biomassa, com eficiência de remoção de DQO bastante estável ao longo do tempo – $90 \pm 4 \%$ para ambos reatores. A biomassa teve um período de adaptação de poucos dias, o que não foi possível precisar, pois o início do monitoramento analítico começou a ser feito somente no 10º dia de operação dos reatores, que já estavam apresentando eficiência de remoção de DQO superior a 90 %, o que evidencia o rápido tempo de partida do sistema. Vale ressaltar que o inóculo apresenta uma comunidade microbiana bem estabelecida e diversificada, com alta abundância de arqueias metanogênicas acetoclásticas (DELFORNO et al., 2017), já adaptada a condições anaeróbias e a uma alta carga orgânica volumétrica aplicada, o que explica o rápido tempo de partida dos reatores com alta remoção de matéria orgânica.

Figura 46 - Variação temporal da DQO afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de I a IV

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

A primeira fase teve um período de 71 dias de operação, que foi suficiente para atingir a estabilidade no desempenho dos reatores e preparo da curva analítica dos antibióticos. As Figuras 47 e 48 mostram os gráficos referentes a remoção dos antibióticos SMX e CIP para as Fases II, III e IV, com duração de 82, 199 e 70 dias, respectivamente. Entre as Fases II e III houve um período de 14 dias sem adição de antibiótico para minimizar o possível efeito de um fármaco sobre o outro.

Figura 47 - Variação temporal da concentração de SMX afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases II e IV

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Figura 48 - Variação temporal da concentração de CIP afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases III e IV

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

O longo período de duração da Fase III foi devido a problemas analíticos e operacionais. Inicialmente na Fase III observou-se uma alteração nos picos dos cromatogramas da CIP, com atraso no tempo de retenção e alargamento dos picos, o que resultou em possíveis erros de quantificação do analito. Como a coluna cromatográfica era compartilhada no laboratório e usada para diferentes matrizes e analitos, supôs-se uma interferência de outras amostras na quantificação de CIP. Procedeu-se dessa forma, a aquisição de uma nova coluna cromatográfica exclusiva para a análise dos antibióticos.

Outra questão levantada nessa fase foi a diferença observada na concentração de matéria orgânica e antibióticos no substrato de alimentação bruto e nas amostras coletadas imediatamente nos pontos de entrada no reator (P_0 – Figura 29), o que levou a considerar para efeito de cálculo de desempenho dos reatores como amostra afluente àquela correspondente ao ponto zero. Essa diferença pode ser devida a algum tipo de interferência dos componentes do esgoto lab-made ou da biomassa acumulada nas linhas de alimentação, causando uma biodegradação prévia ao reator. De fato, observou-se que o amido adicionado no esgoto lab-made não era totalmente solubilizado nas condições de preparo da solução, o que também poderia contribuir para a sorção dos antibióticos nas partículas precipitadas do meio. Além disso, outro problema nessa fase foi a interrupção repentina do espectrômetro de massas por problemas elétricos e nos componentes internos do equipamento, sendo necessária a manutenção corretiva do mesmo por assistência técnica especializada.

Em termos de desempenho na remoção dos antibióticos, os reatores apresentaram altas eficiências médias de remoção – SMX: $91 \pm 4 \%$ para ambos reatores; CIP: $88 \pm 8 \%$ e $86 \pm 13 \%$ para o RALFE e RALFO, respectivamente, sendo que para a sulfonamida houve uma maior estabilidade de remoção, acompanhada de maior controle na sua concentração afluente. Chatila et al. (2016), avaliando a remoção de SMX e CIP em reator anaeróbio horizontal de leito fixo com espuma de poliuretano, também observaram alta eficiência de remoção no sistema – 97% , para concentrações afluentes para SMX de 20 e $40 \mu\text{g L}^{-1}$ e para CIP de 2 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Figura 49 encontram-se os gráficos boxplot de distribuição dos resultados de eficiência de remoção de DQO, SMX e CIP para cada fase operacional e na Tabela 14 apresentam-se os resultados médios obtidos, juntamente com as concentrações médias afluente e efluente.

Figura 49 - Boxplot da remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a IV

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Tabela 14 - Resultados de DQO, SMX, CIP e eficiência de remoção nos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão

Parâmetro (Unidade)	Fase I		Fase II		Fase III		Fase IV	
	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO
DQO Afluente (mg L ⁻¹)	275,0 19,6	275,0 19,6	257,6 9,7	257,6 9,7	265,6 19,9	267,7 19,9	296,1 25,4	290,6 23,5
DQO Efluente (mg L ⁻¹)	26,8 8,0	28,3 7,8	38,9 7,1	41,2 7,1	23,0 6,6	23,0 5,5	21,0 4,5	19,3 5,1
Remoção DQO (%)	90,1 3,5	89,6 3,3	84,9 3,0	84,0 2,9	91,3 2,5	91,4 2,1	92,8 1,8	93,9 1,9
SMX Afluente (ng L ⁻¹)	-	-	428,1 36,3	428,1 36,3	-	-	347,1 50,2	349,4 44,6
SMX Efluente (ng L ⁻¹)	-	-	44,8 11,7	53,0 8,9	-	-	27,2 17,5	23,9 16,1
Remoção SMX (%)	-	-	89,6 2,1	87,6 2,1	-	-	92,6 3,9	93,5 3,7
CIP Afluente (ng L ⁻¹)	-	-	-	-	293,5 102,3	287,1 88,0	399,7 111,2	441,1 110,5
CIP Efluente (ng L ⁻¹)	-	-	-	-	36,0 26,3	41,9 38,9	59,1 39,8	64,5 49,3
Remoção CIP (%)	-	-	-	-	88,9 7,0	86,5 13,8	85,3 9,8	85,4 11,0

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar uma diminuição na eficiência de remoção de DQO em ambos os reatores da Fase I para a Fase II, confirmado por teste estatístico de Tukey a um nível de significância (α) de 5 %. Isso pode ser devido a introdução do antibiótico SMX no sistema, mas também a uma diminuição da DQO média afluente, devido ao melhor controle da diluição do esgoto lab-made durante a segunda fase operacional, com um menor desvio dos dados nessa fase. Para as Fases III e IV, constatou-se remoção de DQO estatisticamente igual a Fase I, denotando a estabilidade do reator ao longo do tempo e a não influência dos antibióticos sobre a remoção global de matéria orgânica.

Com relação a remoção de SMX, observa-se um aumento na eficiência da Fase II para a Fase IV, podendo a remoção desse composto estar atrelada diretamente a remoção de DQO. Este comportamento não foi observado nos dois reatores para CIP, uma vez que no RALFE houve diminuição na remoção de CIP da Fase III para a Fase IV e sem alteração para o RALFO. Essas hipóteses serão mais bem discutidas na seção 5.4.

Comparando-se os reatores, não foi constatada diferença significativa ($\alpha = 5\%$) entre eles na remoção global de DQO, SMX e CIP no período operacional avaliado.

5.2.2. Produção e rendimento de metano

Na Figura 50 são apresentados os resultados referentes à composição do biogás, produção, vazão molar e rendimento de CH_4 . Não foram detectados níveis de $\text{H}_2(\text{g})$ e $\text{H}_2\text{S}(\text{g})$ no biogás pelo método considerado, sendo sua composição devida somente às parcelas de CH_4 e $\text{CO}_2(\text{g})$ (X_{CH_4} e X_{CO_2}), conforme Figura 50a. Ambos os reatores tiveram uma alta porcentagem de $\text{CH}_4(\text{g})$ no biogás ($> 90\%$), que se manteve estável ao longo do tempo e que não foi alterada pela aplicação dos antibióticos nos reatores. Na Tabela 15 são apresentados os resultados médios referentes a esses parâmetros.

Figura 50 - Variação temporal da composição do biogás (a); produção volumétrica e vazão molar de $\text{CH}_4(\text{g})$ (b); e rendimento de $\text{CH}_4(\text{g})$ (c) nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a IV

Fonte: Autoria própria.

Tabela 15 - Resultados de fração molar, vazão molar, produção volumétrica e rendimento de metano nos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão

Parâmetro (Unidade)	Fase I		Fase II		Fase III		Fase IV	
	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO
Vazão de Biogás (mL d ⁻¹)	138	126	218	172	293	268	319	285
PV _{CH₄} ' ⁽¹⁾	62	48	63	62	43	51	23	40
(mLCH ₄ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	48	44	75	59	100	91	108	95
PV _{CH₄}	22	17	21	21	15	17	7	11
(mLCH ₄ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	62	47	96	64	129	98	139	102
v _{CH₄}	28	18	28	23	19	19	10	11
(mmolCH ₄ d ⁻¹)	4,7	4,3	7,4	5,8	9,9	9,0	10,6	9,4
η _{CH₄} ⁽²⁾	2,1	1,6	2,1	2,1	1,5	1,7	0,7	1,0
X _{CH₄} (%)	130	99	221	151	268	199	252	186
	66	45	70	57	39	40	34	28
	93,2	92,9	92,7	92,6	92,2	91,7	92,2	92,3
	0,6	0,8	1,0	0,8	1,2	1,8	0,3	0,4

⁽¹⁾ PV_{CH₄}' - Produção volumétrica considerando o volume total útil sem material suporte de cada reator

⁽²⁾ Unidade em mLCH₄ g⁻¹DQOremovida

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 51 são apresentados os gráficos de boxplot referentes aos dados de produção e rendimento de metano. Pode-se observar uma grande variação dos valores amostrais ao longo do tempo, sobretudo devido à alta instabilidade da vazão de biogás produzida. Isso provavelmente foi devido a flutuações de nível do headspace no reator e dificuldades encontradas na medição do volume de biogás pelo dispositivo, uma vez que a quantidade de gás produzida nestes reatores foi muito baixa e muito próxima ao limite mínimo de detecção do gasômetro, sendo que qualquer perda de carga influenciava na transferência gasosa.

Da Fase I para a Fase III, houve aumento da vazão de biogás produzida, dada pela menor variação do nível do headspace e maior estabilidade operacional dos reatores. Devido a isso, houve aumento estatisticamente significativo ($\alpha = 5\%$) na produção volumétrica, vazão molar e rendimento de metano para ambos reatores, conforme pode ser observado nos resultados médios da Tabela 15. Para a Fase IV, houve menor variação dos dados sem ser constatada diferença significativa comparado à Fase III, denotando que os reatores atingiram estabilidade na produção de metano aplicando TDH de 12 h.

Figura 51 - Boxplot da produção volumétrica, vazão molar e rendimento de CH₄ nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a IV

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Comparando-se os reatores, o RALFE apresentou produção volumétrica, vazão molar e rendimento de CH₄ superior ao RALFO, aplicando ANOVA ($\alpha = 5\%$). Essa maior produção de CH₄ no RALFE foi devida a maior concentração de biomassa ativa no leito reacional, resultante da maior quantidade de EPU (conforme descrito na Tabela 7) e, por conseguinte, maior superfície específica para adesão dos microrganismos. De fato, o conteúdo de biomassa em cada leito reacional foi quantificado ao final da operação dos reatores, conforme detalhado na seção 5.5, e foi significativamente superior no leito empacotado. Dessa forma, levando-se

em conta a quantidade de biomassa em cada reator (expressa como SSV), foi possível calcular os valores específicos de produção e rendimento de metano, sendo os resultados expressos na Tabela 16. Assim, comparando-se esses resultados específicos, tem-se que os reatores apresentaram performances similares na produção e rendimento de metano.

Tabela 16 - Valores específicos (* - em termos de SSV) de produção volumétrica, vazão molar e rendimento de metano nos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão

Parâmetro (Unidade)	Fase I		Fase II		Fase III		Fase IV	
	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO
$PV_{CH_4}^{*(1)}$	3,0	3,4	4,7	4,6	6,3	7,1	6,8	7,4
($mLCH_4 L^{-1} d^{-1} g^{-1} SSV$)	1,4	1,3	1,3	1,7	0,9	1,4	0,5	0,8
$v_{CH_4}^*$	0,30	0,33	0,46	0,46	0,62	0,70	0,67	0,69
($mmolCH_4 d^{-1} g^{-1} SSV$)	0,13	0,13	0,13	0,16	0,09	0,13	0,05	0,19
$\eta_{CH_4}^{*(2)}$	8,2	7,7	13,9	11,8	16,8	15,6	15,8	14,5
	4,2	3,5	4,4	4,4	2,5	3,1	2,1	2,2

⁽¹⁾ $PV_{CH_4}^*$ - Produção volumétrica específica considerando o volume total útil sem material suporte de cada reator

⁽²⁾ Unidade em $mLCH_4 g^{-1} DQOremovida g^{-1} SSV$

Fonte: Autoria própria.

Além desses resultados, pode-se inferir que a presença dos antibióticos (Fases II, III e IV) nas condições testadas não interferiu na produção de metano, uma vez que a composição do biogás, a produção e o rendimento de metano não foram afetados. De fato, Cetecioglu et al. (2015), estudando a biodegradação de SMX e seu efeito sobre a metanogênese durante o tratamento anaeróbio de efluente de indústria farmacêutica, encontraram que somente a partir da concentração de $40 \text{ mgSMX } L^{-1}$ começou a ocorrer inibição da metanogênese, sendo que 45 mgSMX.L^{-1} foi letal para a comunidade microbiana de arqueias metanogênicas acetoclásticas, gerando um acúmulo de AGV no efluente e reduzindo a biodegradação do fármaco a quase 0 %. Vale ressaltar que essas concentrações inibitórias ou letais obtidas pelos autores não são tipicamente encontradas nas matrizes ambientais, conforme pode ser observado pelos valores apresentados na literatura (Tabela 1).

5.2.3. Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP

Na Figura 52 encontram-se os perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP nos dois reatores e na Tabela 17 são apresentados os parâmetros de ajuste do modelo cinético de primeira ordem estimado, conforme Equação 13 apresentada. Os ajustes do modelo exponencial foram calculados com o auxílio do software OriginPro 8.6. Assim como para os

valores de produção e rendimento de metano específicos, as constantes cinéticas específicas (* - em termos de SSV) também foram calculadas a fim de normalizar a diferença de concentração de biomassa entre os dois reatores.

Figura 52: Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores para as Fases de I a IV. As linhas correspondem ao ajuste do modelo cinético de primeira ordem com concentração residual obtido por meio do software OriginPro 8.6

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Tabela 17 - Parâmetros do modelo cinético de primeira ordem estimado para remoção de DQO, SMX e CIP para as Fases de I a IV. Concentrações C_0 e C_R em mg L^{-1} para DQO e ng L^{-1} para SMX / CIP; k^{app} em h^{-1} ; e $k^{\text{app}*}$ em $\text{h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$

	RALFE					RALFO				
	C_0	C_R	k^{app}	$k^{\text{app}*}$	r^2	C_0	C_R	k^{app}	$k^{\text{app}*}$	r^2
DQO Fase I	269	37	0,79	0,050	0,995	269	40	0,66	0,052	0,999
DQO Fase II	271	29	0,50	0,031	0,999	275	24	0,40	0,031	0,981
DQO Fase III	263	<LD*	0,27	0,017	0,994	277	11	0,35	0,027	0,959
DQO Fase IV	269	46	0,74	0,046	0,929	273	<LD	0,23	0,018	0,995
SMX Fase II	434	36	0,53	0,033	0,997	439	37	0,54	0,042	0,981
SMX Fase IV	309	15	0,70	0,044	0,997	311	<LD	0,36	0,028	0,988
CIP Fase III	337	41	0,88	0,055	0,975	342	50	0,69	0,054	0,971
CIP Fase IV	375	29	0,74	0,046	0,960	404	20	0,52	0,041	0,998

* LD - limite de detecção.

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Pode-se constatar pelos resultados apresentados que o modelo cinético de primeira ordem se ajustou muito bem aos dados, com $r^2 > 0,9$. Observou-se que a introdução dos antibióticos (Fase II, III e IV) resultou em diminuição da constante cinética aparente de remoção de DQO nos reatores. No entanto, observou-se que a remoção global de matéria orgânica não foi afetada diretamente, já que o TDH de 12 h aplicado se mostrou superior ao mínimo necessário para garantir conteúdo residual de DQO estável na saída dos reatores.

Comparando-se os reatores em termos de cinética de remoção aparente global de SMX e CIP, esta se mostrou mais favorável no RALFE, provavelmente devido à conformação do leito, que permite um maior contato do substrato com a biomassa, que se apresenta em maior concentração no leito empacotado, conforme será discutido na seção 5.5. Entretanto, tomando-se as constantes cinéticas de remoção específicas, tem-se que os reatores apresentaram comportamentos cinéticos similares.

Comparando-se o decaimento cinético entre os antibióticos, observou-se que as constantes cinéticas de CIP foram superiores às de SMX ($k_{\text{CIP}}^{\text{app}} > k_{\text{SMX}}^{\text{app}}$), uma vez que a remoção de CIP foi influenciada diretamente pelo conteúdo de biomassa presente no reator, sendo que essa se concentrou mais na parte inferior do leito reacional, favorecendo a cinética de eliminação de CIP do meio. Isso será mais bem discutido na seção 5.6.

5.2.4. Demais parâmetros operacionais e resultados médios obtidos

Na Tabela 18 são apresentados os resultados médios dos demais parâmetros de controle operacional avaliados ao longo do tempo.

O pH e a alcalinidade se mantiveram estáveis, sendo que em todo o período de operação dos reatores houve produção de alcalinidade no meio, o que indica boas condições de tamponamento. A relação entre a alcalinidade intermediária (AI – referente aos ácidos voláteis) e a alcalinidade parcial (AP – referente a bicarbonato) manteve-se próxima de 0,3 na saída dos reatores, evidenciando a não ocorrência de distúrbios na digestão anaeróbia, de acordo com Ripley, Boyle e Converse (1986).

Não houve acúmulo de ácidos orgânicos voláteis nos reatores, uma vez que os resultados apresentados se mostraram irrisórios, o que corrobora a eficiência da metanogênese, sendo a DQO do substrato de alimentação totalmente convertida a metano e $\text{CO}_{2(g)}$, acompanhado pela alta fração molar de $\text{CH}_{4(g)}$ no biogás, conforme apresentado anteriormente. Entretanto, analisando as amostras afluentes de cada reator denotadas por AE e AO, coletadas no ponto 0 (Figura 29), observou-se uma diminuição do pH afluente, acompanhada da geração de ácidos orgânicos voláteis previamente à zona de biorreação. Isso foi devido à fermentação que ocorre no substrato de alimentação (amostra A). Ainda assim, esses ácidos gerados não trouxeram nenhum impacto sobre o desempenho dos reatores.

Outros produtos intermediários da fermentação como etanol e acetona apareceram em pequenas quantidades na saída dos reatores, contribuindo para a DQO residual efluente. Os demais produtos da fermentação que não foram citados na Tabela 18 - ácido valérico, ácido capróico, metanol e n-butanol, não foram detectados em 100 % das amostras analisadas.

Com relação ao teor de sólidos efluente, observou-se que não houve arraste expressivo de biomassa do sistema em ambos reatores, o que evidencia as boas condições do leito fixo com espuma de poliuretano na aderência da biomassa e formação do biofilme. O teor de sólidos totais efluente foi devido principalmente a parcela dissolvida que representou 95 ± 3 % do total de sólidos.

Tabela 18 - Compilação dos resultados dos parâmetros operacionais dos reatores para as Fases de I a IV. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão

Parâmetro (Unidade)	Fase I			Fase II			Fase III				Fase IV			
	A	E	O	A	E	O	AE	AO	E	O	AE	AO	E	O
pH	7,84 0,14	7,50 0,11	7,32 0,15	7,90 0,11	7,43 0,18	7,28 0,13	7,42 0,16	7,43 0,16	7,57 0,20	7,56 0,24	7,56 0,15	7,55 0,17	7,77 0,14	7,81 0,17
Alcalinidade (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	205 22	276 19	274 17	214 22	286 33	287 30	236 11	240 12	292 12	293 11	246 15	247 22	292 18	290 18
Al/AP	0,34 0,07	0,34 0,04	0,37 0,06	0,29 0,03	0,36 0,08	0,37 0,07	0,48 0,09	0,50 0,08	0,27 0,05	0,28 0,08	0,48 0,08	0,49 0,06	0,18 0,04	0,18 0,03
Ácido Acético (mg L ⁻¹)	-	3,3 6,0	ND*	-	0,8 2,7	ND	51,1 32,2	50,4 11,6	0,3 0,5	0,3 0,8	52,2 16,3	36,3 33,3	3,5 4,4	ND
Ácido Propiônico (mg L ⁻¹)	-	ND	ND	-	ND	ND	5,4 6,3	9,5 11,5	ND	ND	ND	10,0 7,1	ND	ND
Ácido Isobutírico (mg L ⁻¹)	-	ND	1,0 2,9	-	ND	ND	2,0 4,1	7,0 4,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Butírico (mg L ⁻¹)	-	0,7 2,1	ND	-	0,6 1,8	0,6 1,8	2,5 4,1	5,5 4,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Isovalérico (mg L ⁻¹)	-	1,3 3,6	2,8 5,1	-	1,3 4,2	1,0 3,2	2,6 5,2	8,8 5,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AVT (mg L ⁻¹)	-	5,3 10,5	3,8 7,2	-	2,8 5,8	1,6 4,9	63,7 40,9	63,4 24,3	0,3 0,5	0,3 0,8	52,2 16,3	46,3 26,2	3,5 4,4	ND
Acetona (mg L ⁻¹)	-	ND	0,2 0,3	-	0,2 0,3	0,4 0,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etanol (mg L ⁻¹)	-	10,0 4,8	7,8 7,2	-	7,0 7,2	8,5 4,6	4,9 5,6	6,6 4,5	2,4 4,4	3,0 4,9	ND	ND	ND	ND
ST (mg L ⁻¹)	-	520 96	527 55	-	580 10	596 29	-	-	559 21	551 31	-	-	673 152	645 108
SDT (mg L ⁻¹)	-	490 105	502 45	-	547 21	573 18	-	-	523 29	520 42	-	-	647 164	613 122
SST (mg L ⁻¹)	-	30 9	25 10	-	34 12	23 13	-	-	36 9	31 15	-	-	27 16	33 21
SSF (mg L ⁻¹)	-	15 1	3 1	-	17 12	9 10	-	-	11 12	7 8	-	-	9 12	17 12
SSV (mg L ⁻¹)	-	15 7	22 9	-	17 2	14 4	-	-	25 6	24 10	-	-	18 6	16 10

* ND - Não detectado

Fonte: Autoria própria.

5.3. Otimização do TDH por meio dos perfis cinéticos e hidrodinâmicos

Conforme discutido anteriormente, pela análise dos perfis cinéticos espaciais dos reatores, pode-se inferir à primeira vista que o TDH de 12 h adotado foi superestimado, uma vez que as concentrações residuais dos fármacos ficaram constantes em TDH inferior a 12 h (considerando as Fases II, III e IV). Dessa forma, por meio dos resultados dos ensaios hidrodinâmicos (seção 5.1) e considerando os modelos cinéticos de primeira ordem obtidos para a degradação de SMX e CIP na seção 5.2.3, buscou-se otimizar o TDH empregado a fim

de se obter o mínimo TDH necessário para garantir uma dada eficiência de remoção dos antimicrobianos.

De acordo com Levenspiel (1999), considerando pequenos desvios do reator tubular ideal (reator plug-flow), ou seja, $D/uL < 0,01$ (dispersão de pequena intensidade), pode-se chegar na Equação 26, para reações de primeira ordem. Por meio da resolução da equação, pode-se obter o TDH (θ_h) mínimo para uma dada eficiência de remoção X_R de SMX e CIP. Para isso, foram tomadas as constantes cinéticas aparentes de remoção indicadas na Tabela 17 e adotado 90 % de eficiência de remoção (X_R) para os antibióticos. Os resultados encontram-se na Tabela 19.

$$\frac{C_R}{C_0} = 1 - X_R = e^{[-k_1 \cdot \theta_h + (k_1 \cdot \theta_h)^2 \frac{D}{uL}]} \quad \text{Equação 26}$$

Tabela 19 - Cálculo do TDH mínimo aplicável a partir dos resultados do ensaio hidrodinâmico e dos parâmetros do modelo de dispersão longitudinal dos reatores

Reator	AB – Fase	TDH atual (h)	Remoção esperada – X_R (%)	D/uL	k_1	TDH mínimo estimado (h)
RALFE	SMX Fase II	12	90	0,00353	0,53	4,4
RALFE	SMX Fase IV	12	90	0,00353	0,70	3,3
RALFE	CIP Fase III	12	90	0,00353	0,88	2,6
RALFE	CIP Fase IV	12	90	0,00353	0,74	3,1
RALFO	SMX Fase II	12	90	0,00268	0,54	4,3
RALFO	SMX Fase IV	12	90	0,00268	0,36	6,4
RALFO	CIP Fase III	12	90	0,00268	0,69	3,3
RALFO	CIP Fase IV	12	90	0,00268	0,52	4,4

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 19, o TDH poderia ser otimizado para 4 e 6 h, respectivamente para CIP e SMX, considerando os casos mais críticos, ou seja, cinética menos favorável. Assim, adotou-se para as fases seguintes a aplicação de TDH de 8 h (Fase V) e 4 h (Fase VI). O TDH de 8 h foi adotado de forma a não haver um choque de carga orgânica e de antibióticos no sistema de tratamento e avaliar o real efeito da diminuição do TDH sobre a remoção dos fármacos.

5.4. Avaliação da influência do TDH e do substrato sobre o desempenho dos reatores

Conforme descrito na seção 4.1, como etapa final de operação dos reatores, foi adotada, como estratégia, a aplicação de esgoto doméstico como substrato de alimentação a fim de

avaliar o efeito de matriz sobre a remoção dos fármacos. A ideia inicial era testar, assim como para o substrato lab-made, o efeito da diminuição do TDH sobre a remoção de SMX e CIP no esgoto. No entanto, conforme será discutido nas seções seguintes, uma vez que essa diminuição não foi benéfica à remoção dos antimicrobianos, foi avaliado a aplicação de esgoto somente em TDH de 12 h (Fase VII) e os resultados são, portanto, discutidos em conjunto com as Fases IV, V e VI, de forma a facilitar a discussão dos resultados.

5.4.1. Remoção de DQO, SMX e CIP

A Figura 53 apresenta os gráficos da variação temporal de DQO nos dois reatores para as Fases operacionais de IV a VII, que tiveram duração de 70, 91, 56 e 101 dias, respectivamente. As Figuras 54 e 55 mostram os gráficos referentes à remoção de SMX e CIP, ao longo das Fases de IV a VII. Na Figura 56 encontram-se os gráficos de boxplot da remoção de DQO, SMX e CIP para essas fases operacionais.

Figura 53 - Variação temporal da DQO afluyente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de IV a VII

Fonte: Autoria própria.

Figura 54 - Variação temporal da concentração de SMX afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de IV a VII

Fonte: Autoria própria.

Figura 55 - Variação temporal da concentração de CIP afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores RALFE (a) e RALFO (b) para as Fases de IV a VII

Fonte: Autoria própria.

Figura 56 - Boxplot da remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores RALFE e RALFO para as fases de IV a VII

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 20 indica os valores médios das concentrações afluente e efluente de matéria orgânica (como DQO), SMX e CIP para as Fases de IV a VII, bem como da eficiência de remoção e das cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicada e removida do sistema. Com a diminuição do TDH de 12 para 4 h, aumentou-se a carga orgânica aplicada pelo aumento da vazão afluente. Observou-se um aumento da DQO afluente para a Fase VI, devido a maior velocidade ascensional (conforme apresentado na Tabela 20), resultante do aumento da vazão

de alimentação, gerando um menor acúmulo de biomassa nas linhas afluentes, e, portanto, menor degradação da matéria orgânica previamente ao reator.

Tabela 20 - Valores de DQO, SMX, CIP, eficiência de remoção, COV e velocidade ascensional nos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão.

Parâmetro (Unidade)	Fase IV		Fase V		Fase VI		Fase VII	
	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO
DQO Afluente (mg L ⁻¹)	296,1	290,6	286,4	282,6	330,3	328,5	393,4	426,8
DQO Efluente (mg L ⁻¹)	25,4	23,5	27,7	33,2	23,5	19,9	108,5	126,1
Remoção DQO (%)	21,0	19,3	19,3	14,2	69,9	41,2	74,6	78,9
COV aplicada (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	4,5	5,1	7,0	5,9	20,3	16,5	24,4	26,8
COV removida (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	92,8	93,9	93,3	95,0	78,8	87,5	80,1	80,7
SMX Afluente (ng L ⁻¹)	1,8	1,9	2,2	2,0	6,1	4,9	7,2	7,0
SMX Efluente (ng L ⁻¹)	0,59	0,58	0,86	0,85	1,98	1,97	0,79	0,85
Remoção SMX (%)	0,05	0,05	0,08	0,10	0,14	0,12	0,22	0,25
CIP Afluente (ng L ⁻¹)	0,55	0,54	0,80	0,81	1,56	1,72	0,64	0,70
CIP Efluente (ng L ⁻¹)	0,05	0,05	0,07	0,10	0,17	0,14	0,22	0,24
Remoção CIP (%)	347,1	349,4	418,9	408,7	393,2	401,7	427,6	413,0
Velocidade ascensional (m h ⁻¹)	50,2	44,6	50,8	50,5	55,8	55,9	137,2	161,0
	27,2	23,9	49,9	33,7	124,0	75,6	102,4	116,3
	17,5	16,1	13,8	14,2	33,5	32,8	57,7	72,3
	92,6	93,5	88,1	91,8	68,6	81,3	77,6	72,6
	3,9	3,7	3,0	3,4	7,3	7,1	9,1	12,8
	399,7	441,1	463,4	388,1	487,4	500,9	220,3	238,0
	111,2	110,5	87,3	78,1	56,2	49,2	99,1	124,1
	59,1	64,5	151,5	131,6	162,4	178,5	66,4	59,6
	39,8	49,3	59,2	49,8	32,2	42,0	39,2	36,6
	85,3	85,4	65,7	64,8	66,0	64,3	67,0	72,4
	9,8	11,0	16,7	16,0	8,7	8,4	19,1	14,2
	0,035	0,042	0,052	0,062	0,104	0,125	0,035	0,042

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados tabelados e gráficos apresentados, pode-se notar que, com a diminuição do TDH aplicado de 12 para 8 h, não houve redução significativa na remoção de DQO e SMX do sistema, enquanto para a CIP essa redução afetou o desempenho dos reatores. Com a diminuição do TDH para 4 h, houve uma queda geral no desempenho dos reatores na remoção de DQO, que também foi acompanhada pela diminuição da eficiência de eliminação de SMX e CIP.

Tem-se como hipótese que, com a diminuição do TDH, houve uma diminuição do tempo de contato substrato-biomassa (ou antibiótico-biomassa), resultando na diminuição do desempenho dos reatores. Salienta-se que o aumento da carga afluente dos antibióticos SMX e

CIP, pela diminuição do TDH, não interferiu diretamente na remoção de DQO na Fase V, porém impactou na Fase VI, limitando a capacidade de tratamento do sistema.

Brandt et al. (2013), avaliando a remoção de vários micropoluentes orgânicos em reator UASB em escala plena tratando esgoto doméstico, constataram que o TDH foi um parâmetro operacional importante na eliminação dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim, observando um aumento na remoção de SMX de 22 para 53 % com o aumento do TDH de 5,4 h para 11 h. Chelliapan, Wilby e Sallis (2011), avaliando o efeito da redução do TDH de 4 para 1 d, sem aumento de COV afluente em reator anaeróbio, observaram uma redução significativa na remoção de DQO de 92 para 77 %. Gros, Petrović e Barceló (2007) avaliaram o comportamento de vários compostos nas ETEs de lodos ativados tratando efluentes domésticos e industriais e constataram uma relação entre a diminuição do TDH e a diminuição da eficiência de remoção da fluoroquinolona ofloxacina. Estrada-Arriaga e Mijaylova (2011), Johnson et al. (2005) e Hashimoto et al. (2007) estudaram a remoção de estrogênios em sistemas de tratamento aeróbio e constataram efeito benéfico na remoção de E1, E2 e EE2 com o aumento do TDH, porém enfatizaram que o tempo de retenção celular exercia maior influência na remoção desses compostos. Santos et al. (2009) também encontraram correlação positiva entre o aumento do TDH e o aumento da remoção do anti-inflamatório naproxeno em uma planta de lodos ativados.

Com relação a aplicação de esgoto doméstico como substrato de alimentação dos reatores durante a Fase VII e ao se comparar com a Fase IV (de mesmo TDH – 12 h), nota-se uma redução significativa na remoção de DQO, SMX e CIP, possivelmente devido à presença de matéria orgânica complexa no esgoto, bem como diversos outros micropoluentes orgânicos e microrganismos na matriz, promovendo a alteração da comunidade microbiana presente nos reatores ou inibindo a atividade biológica. De fato, por meio das análises de biologia molecular que serão detalhadas na seção 5.8.1, observou-se uma mudança drástica na estrutura da microbiota do leito reacional quando alimentado com esgoto sanitário, notadamente na população de arqueias metanogênicas, o que contribuiu para redução do desempenho do sistema na remoção de matéria orgânica e de antibióticos.

Na Figura 57 estão os gráficos dos valores de carga de SMX e CIP removida com relação a carga de DQO removida para as Fases de IV a VII. Observa-se que com o aumento da carga orgânica removida, ocorreu um aumento concomitante na carga removida dos fármacos, apresentando uma forte correlação linear positiva entre as remoções ($r^2 = 0,9$). Infere-se, portanto, que a eliminação de SMX e CIP ocorre por meio de biodegradação cometabólica à eliminação de matéria orgânica do meio.

Figura 57 - Relação entre carga removida de DQO e a carga removida de SMX (a) e CIP (b) dos reatores RALFE e RALFO. Linhas pontilhadas correspondem a correlação linear entre as variáveis.

Fonte: Autoria própria.

Oliveira, Santos-Neto e Zaiat (2017), estudando a remoção de sulfametazina (antibiótico da classe das sulfonamidas) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo tratando substrato lab-made simulando água residuária de suinocultura, também observaram efeito de cometabolismo na remoção do fármaco. Gonzalez-Gil, Carballa e Lema (2017), investigando os mecanismos de biotransformação de vários micropoluentes orgânicos, incluindo o antibiótico sulfametoxazol, constataram que existe um cometabolismo enzimático na biodegradação desse composto, mediado pela enzima acetato-quinase, mas sugerem também que outras enzimas presentes na digestão anaeróbia podem influenciar na biotransformação desses fármacos. Fischer e Majewsky (2014) enfatizam ainda que a degradação cometabólica é o principal mecanismo de remoção para os micropoluentes orgânicos durante o tratamento biológico de águas residuárias. Recentemente, Peng et al. (2019), estudaram os mecanismos de remoção de sete diferentes compostos farmacêuticos em lodos ativados, incluindo as sulfonamidas sulfametoxazol e sulfametazina (SMZ) e a fluoroquinolona norfloxacin (NOR). Os autores

avaliaram a biodegradação em condição heterotrófica e autotrófica nitrificante, bem como os mecanismos de adsorção, hidrólise e oxidação. Para as sulfonamidas, a biodegradação heterotrófica via remoção de DQO foi a rota preponderante, com 39 e 26 % de remoção por essa via para SMZ e SMX, respectivamente, sendo os demais mecanismos de menor significância. Para NOR, a remoção por adsorção foi de 14 %, enquanto a biodegradação via DQO foi de 34 %, também representando o principal mecanismo de remoção. Os estudos citados corroboram, portanto, a hipótese do cometabolismo na biodegradação de SMX e CIP via remoção de DQO.

5.4.2. Produção e rendimento de metano

Na Figura 58 e na Tabela 21 são apresentados os resultados referentes à composição do biogás, produção, vazão molar e rendimento de $\text{CH}_{4(g)}$ para as Fases de IV a VII. Assim como nas Fases de I a III, a composição do biogás foi devida somente às frações de $\text{CH}_{4(g)}$ e $\text{CO}_{2(g)}$ (X_{CH_4} e X_{CO_2}), não sendo detectado $\text{H}_2\text{S}_{(g)}$. A fração molar de $\text{CH}_{4(g)}$ manteve-se alta (> 90 %) durante todo o período operacional, e não foi alterada pela diminuição do TDH, nem pela aplicação de esgoto doméstico como substrato de alimentação na Fase VII. Na Figura 59 são apresentados os gráficos de boxplot para os valores de produção e rendimento de metano.

Figura 58 - Variação temporal da composição do biogás (a); produção volumétrica e vazão molar de $\text{CH}_{4(g)}$ (b); e rendimento de $\text{CH}_{4(g)}$ (c) nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de IV a VII

Fonte: Autoria própria.

Tabela 21 - Resultados de fração molar, vazão, produção volumétrica e rendimento de metano nos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão

Parâmetro (Unidade)	Fase IV		Fase V		Fase VI		Fase VII	
	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO
Vazão de Biogás (mL d ⁻¹)	319	285	438	420	562	646	184	177
PV _{CH₄} ⁽¹⁾ (mLCH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹)	23	40	44	58	70	122	51	49
PV _{CH₄} ⁽¹⁾ (mLCH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹)	108	95	151	145	193	221	65	62
PV _{CH₄} (mLCH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹)	7	11	15	20	24	42	18	17
PV _{CH₄} (mLCH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹)	139	102	194	155	248	237	84	67
v _{CH₄} (mmolCH ₄ d ⁻¹)	10	11	19	22	31	45	23	18
v _{CH₄} (mmolCH ₄ d ⁻¹)	10,6	9,4	14,9	14,2	19,0	21,8	6,4	6,1
η _{CH₄} ⁽²⁾	0,7	1,0	1,5	2,0	2,4	4,1	1,8	1,6
η _{CH₄} ⁽²⁾	252	186	366	292	473	412	153	101
X _{CH₄} (%)	34	28	44	49	51	84	54	48
X _{CH₄} (%)	92,2	92,3	92,7	92,7	92,4	92,3	94,7	94,5
	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4	1,3	1,4

⁽¹⁾ PV_{CH₄} - Produção volumétrica considerando o volume total útil sem material suporte de cada reator

⁽²⁾ Unidade em mLCH₄ g⁻¹DQOremovida

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os valores tabelados e gráficos apresentados, pode-se observar que a diminuição do TDH provocou um aumento significativo da vazão molar, produção volumétrica e rendimento de CH_{4(g)}. Isso foi devido ao aumento da vazão de biogás produzida, dado pela maior carga orgânica aplicada e removida do sistema, acompanhado da maior velocidade ascensional (Tabela 20), que resultou em menor resistência à transferência gasosa para o headspace. Chelliapan et al. (2011), estudando a influência da carga orgânica aplicada em reator anaeróbio tratando efluente farmacêutico e de cervejaria, observaram que para um aumento de carga de 0,43 para 1,86 kgDQO m⁻³ d⁻¹, o pH operacional se manteve por volta da neutralidade (próximo de 7), havendo um aumento concomitante na vazão de metano produzida, de 0,79 para 3,43 L d⁻¹. Já para cargas aplicadas acima de 2,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹, o pH foi inferior a 7 com aumento significativo na produção de AGV e redução na produção de metano.

Comparando-se os reatores, com a diminuição do TDH para 8 horas, observou-se que eles apresentaram comportamento semelhante para vazão molar e produção volumétrica de metano, que também foi acompanhada pela mesma eficiência de remoção de DQO da Fase IV para Fase V. Já para a Fase VI (TDH = 4 h), o reator empacotado apresentou menor remoção de DQO, o que ocasionou também menor produção volumétrica e vazão molar de metano comparado ao RALFO. Entretanto, considerando o rendimento de metano dos reatores, este foi maior no RALFE, o que é devido a menor COV removida do sistema. Levando em consideração os valores específicos (* - em termos de SSV) apresentados na Tabela 22, o rendimento de

metano foi equivalente em ambos reatores, e a produção e vazão molar de metano foi superior no RALFO.

Figura 59 - Boxplot da produção volumétrica, vazão molar e rendimento de CH_4 nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de IV a VII

Fonte: Autoria própria.

Evidenciou-se, portanto, a vantagem do RALFO em comparação ao RALFE em termos operacionais e econômicos, uma vez que o leito ordenado apresenta uma quantidade de material suporte inferior ao leito empacotado (Tabela 7), com menor quantidade de biomassa ativa aderida, porém apresentando desempenho na remoção de DQO, SMX e CIP e na produção e

rendimento de metano igual ou superior ao RALFE. Pode-se inferir também por meio desses resultados que o RALFO foi menos sensível ao aumento da carga orgânica e de antibióticos aplicada, resultante do menor TDH, em comparação ao RALFE.

Tabela 22 - Valores específicos (* - em termos de SSV) de produção volumétrica, vazão molar e rendimento de metano nos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão

Parâmetro (Unidade)	Fase IV		Fase V		Fase VI		Fase VII	
	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO	RALFE	RALFO
$PV_{CH_4}^*$ ⁽¹⁾	6,8	7,4	9,5	11,3	12,1	17,3	4,1	4,9
($mLCH_4 L^{-1} d^{-1} g^{-1}SSV$)	0,5	0,8	1,0	1,6	1,5	3,3	1,1	1,3
$v_{CH_4}^*$	0,67	0,69	0,93	1,11	1,19	1,70	0,40	0,48
($mmolCH_4 d^{-1} g^{-1}SSV$)	0,05	0,19	0,09	0,15	0,15	0,32	0,11	0,13
$\eta_{CH_4}^*$ ⁽²⁾	15,8	14,5	23,0	22,8	27,9	30,2	9,6	8,5
	2,1	2,2	2,8	3,8	8,1	10,2	3,4	3,8

⁽¹⁾ $PV_{CH_4}^*$ - Produção volumétrica específica considerando o volume total útil sem material suporte de cada reator

⁽²⁾ Unidade em $mLCH_4 g^{-1}DQOremovida g^{-1}SSV$

Fonte: Autoria própria.

Com a aplicação de esgoto sanitário como substrato de alimentação durante a Fase VII, observou-se uma diminuição na produção e rendimento de metano comparativamente à Fase IV, atribuído à menor eficiência de remoção de matéria orgânica, atrelada à alteração na comunidade microbiana presente no leito reacional, conforme já comentado anteriormente e que será discutido em detalhes na seção 5.8.

5.4.3. Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP

Na Figura 60 encontram-se os perfis espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP nos biorreatores para as Fases de IV a VII, e na Tabela 23 são apresentados os parâmetros de ajuste do modelo cinético de primeira ordem estimado, conforme Equação 13 apresentada.

Figura 60 - Perfis cinéticos espaciais de remoção de DQO, SMX e CIP nos reatores para as Fases de IV a VII. As linhas correspondem ao ajuste do modelo cinético de primeira ordem com concentração residual obtido por meio do software OriginPro 8.6

Fonte: Autoria própria.

Tabela 23 - Parâmetros do modelo cinético de primeira ordem estimado para remoção de DQO, SMX e CIP para as Fases de IV a VII. Concentrações C_0 e C_R em mg L^{-1} para DQO e ng L^{-1} para SMX / CIP; k^{app} em h^{-1} ; e k^{app*} em $\text{h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{SSV}$

	RALFE					RALFO				
	C_0	C_R	k^{app}	k^{app*}	r^2	C_0	C_R	k^{app}	k^{app*}	r^2
DQO Fase IV	269	46	0,74	0,046	0,929	273	<LD	0,23	0,018	0,995
DQO Fase V	267	31	0,73	0,046	0,993	269	23	1,20	0,094	0,988
DQO Fase VI	317	14	0,62	0,039	0,860	326	<LD*	0,90	0,070	0,976
DQO Fase VII	374	51	0,47	0,030	0,998	385	38	0,37	0,029	0,976
SMX Fase IV	309	15	0,70	0,044	0,997	311	<LD	0,36	0,028	0,988
SMX Fase V	262	21	0,63	0,040	0,992	257	<LD	0,49	0,038	0,996
SMX Fase VI	347	104	1,00	0,063	0,891	302	35	1,02	0,080	0,920
SMX Fase VII	520	29	0,22	0,014	0,989	486	86	0,36	0,028	0,894
CIP Fase IV	375	29	0,74	0,046	0,960	404	20	0,52	0,041	0,998
CIP Fase V	407	172	1,00	0,063	0,992	458	177	0,58	0,045	0,992
CIP Fase VI	443	104	0,95	0,060	0,948	409	160	1,67	0,131	0,947
CIP Fase VII	334	71	0,37	0,023	0,982	270	68	0,37	0,029	0,914

*LD - LD é o limite de detecção.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se pelos gráficos que, com a diminuição do TDH, houve uma diferença no perfil de decaimento dos compostos. Com o aumento da vazão afluyente e maior velocidade ascensional no leito (Tabela 20), a biomassa presente no primeiro compartimento do reator, a base cônica, não representou influência significativa no decaimento de DQO e SMX, principalmente para a Fase VI, com maior vazão aplicada. Então, houve um decaimento de ordem zero nesta seção do reator, o que não foi tão expressivo para CIP, o que corrobora a influência da concentração de biomassa sobre a remoção de CIP. Dessa forma, os ajustes de primeira ordem foram feitos a partir do primeiro ponto de amostragem do reator (Figura 29).

Conforme já mencionado anteriormente, o aumento da carga afluyente de antibióticos, da Fase V para a Fase VI, pode ter afetado a remoção de DQO, o que também foi observado pela diminuição da constante cinética aparente. As constantes cinéticas de decaimento de SMX e CIP não foram afetadas nessas fases, porém nota-se uma maior concentração residual desses fármacos, sobretudo para CIP.

Comparando-se os reatores, nota-se que a diminuição do TDH para 8 h foi mais favorável para o RALFO, pois houve um aumento na constante cinética de decaimento de DQO e SMX,

acompanhado de uma maior remoção desses compostos comparativamente ao RALFE. Com o aumento da velocidade ascensional no leito, ocorre uma menor resistência a transferência de massa no reator, o que é favorecido no reator de leito ordenado, cuja conformação é paralela ao fluxo do escoamento, o que pode explicar essa diferença de comportamento dos reatores.

Assim como nas Fases de I a IV, observou-se que a k^{app} de CIP foi maior que a k^{app} de SMX ($k_{CIP}^{app} > k_{SMX}^{app}$), já que a remoção de CIP foi relacionada à quantidade de biomassa presente no reator, uma vez que essa possui maior concentração na parte inferior do leito reacional, conforme será melhor discutido nas seções 5.5 e 5.6.

A presença do esgoto sanitário como substrato de alimentação (Fase VII) levou a uma diminuição da constante cinética aparente de remoção acompanhada também de maior concentração residual efluente, comparando-se com a Fase IV (mesmo TDH). O esgoto apresenta uma matriz orgânica complexa que pode ter afetado a atividade microbiana no reator. Conforme mencionado anteriormente, por meio das análises de biologia molecular que está detalhada na seção 5.8, a presença de esgoto como substrato de alimentação realmente alterou a estrutura da comunidade microbiana, reduzindo o desempenho dos reatores na remoção de DQO e produção de metano, bem como o potencial de biodegradação dos antimicrobianos.

5.4.4. Demais parâmetros operacionais e resultados médios obtidos

Na Tabela 24 são apresentados os resultados médios dos demais parâmetros de controle operacional avaliados durante as Fases operacionais de IV a VII. Com a diminuição do TDH e consequente aumento da velocidade ascensional, houve uma diminuição da relação AI/AP nas amostras afluentes, o que denota um menor grau de fermentação no substrato lab-made, dado pelo menor acúmulo de biomassa nas linhas de alimentação. Já para o esgoto sanitário (Fase VII), observa-se um aumento da relação AI/AP na entrada dos reatores, o que pode ser devido à presença de grupos microbianos fermentativos no esgoto e retorno do TDH para 12 h, favorecendo o acúmulo de biomassa prévio ao reator. Para as amostras efluente, a relação AI/AP foi mantida menor que 0,3, o que é evidenciado também pelo conteúdo irrisório de AGV efluente. Em todo o período de operação houve produção de alcalinidade no meio, o que indica boas condições de tamponamento, sem haver quedas bruscas no pH, mesmo em TDH reduzido (4 h – Fase VI). Vale ressaltar que a maior carga orgânica aplicada nos reatores, por volta de 2 kgDQO m⁻³ d⁻¹ (Fase VI), está dentro da faixa usualmente empregada nos reatores UASB tratando esgoto doméstico, sendo que somente a partir da carga de 3,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹, ocorreria

um excesso de carga hidráulica no sistema, que poderia prejudicar a digestão anaeróbia em termos de acúmulo de AGV e maior conteúdo de CO_{2(g)} no biogás (CHERNICHARO et al., 2015).

Tabela 24 - Compilação dos resultados dos parâmetros operacionais dos reatores para as Fases de IV a VII. Valores em negrito correspondem a média e os demais valores ao desvio padrão

Parâmetro (Unidade)	Fase IV				Fase V				Fase VI				Fase VII			
	AE	AO	E	O	AE	AO	E	O	AE	AO	E	O	AE	AO	E	O
pH	7,56 0,15	7,55 0,17	7,77 0,14	7,81 0,17	7,64 0,14	7,62 0,15	7,76 0,16	7,83 0,15	7,38 0,18	7,37 0,15	7,51 0,16	7,62 0,16	7,50 0,26	7,51 0,27	7,57 0,19	7,61 0,20
Alcalinidade (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	246 15	247 22	292 18	290 18	225 50	233 52	283 63	281 61	227 16	223 13	273 16	288 13	148 21	146 22	175 26	179 17
AI/AP	0,48 0,08	0,49 0,06	0,18 0,04	0,18 0,03	0,38 0,06	0,43 0,07	0,19 0,04	0,19 0,05	0,40 0,05	0,37 0,07	0,28 0,04	0,22 0,04	0,55 0,24	0,58 0,20	0,20 0,04	0,20 0,04
Ácido Acético (mg L ⁻¹)	52,2 16,3	36,3 33,3	3,5 4,4	ND	22,1 18,0	25,4 23,9	13,2 3,7	ND	22,5 22,9	23,5 17,4	25,5 13,1	7,5 4,4	7,4 17,3	15,6 24,1	ND	2,5 5,1
Ácido Propiônico (mg L ⁻¹)	ND	10,0 7,1	ND	ND	0,2 0,4	0,8 1,8	ND	ND	1,2 1,8	2,1 3,8	ND	ND	ND	0,6 1,5	ND	ND
AVT (mg L ⁻¹)	52,2 16,3	46,3 26,2	3,5 4,4	ND	22,3 18,3	26,2 25,0	13,2 3,7	ND	23,7 24,1	25,6 19,9	25,5 13,1	7,5 4,4	7,4 17,3	16,2 23,7	ND	2,5 5,1
Metanol (mg L ⁻¹)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,4 1,0	0,5 1,0
Etanol (mg L ⁻¹)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2 2,6	ND	ND	ND	2,0 5,3	ND	ND	ND	ND	ND
ST (mg L ⁻¹)	-	-	673 152	645 108	-	-	583 208	522 151	-	-	540 35	515 5	448 175	443 123	283 50	287 50
SDT (mg L ⁻¹)	-	-	647 164	613 122	-	-	550 221	497 150	-	-	514 40	487 10	378 163	364 104	235 50	235 44
SST (mg L ⁻¹)	-	-	27 16	33 21	-	-	33 15	25 8	-	-	27 4	30 5	70 21	79 25	48 7	52 11
SSF (mg L ⁻¹)	-	-	9 12	17 12	-	-	16 10	12 9	-	-	7 6	11 6	18 11	21 22	22 9	23 6
SSV (mg L ⁻¹)	-	-	18 6	16 10	-	-	17 9	13 3	-	-	18 7	16 6	52 14	58 20	26 4	29 9

Fonte: Autoria própria.

Com relação ao teor de sólidos efluente, assim como em TDH de 12 h, observou-se, para as Fases V e VI, que não houve desprendimento e arraste expressivo de biomassa do sistema em ambos reatores, o que evidencia as boas condições do leito fixo com espuma de poliuretano na aderência da biomassa e formação do biofilme, mesmo com o aumento da velocidade ascensional. Segundo Chernicharo (2015), os reatores anaeróbios são projetados para uma faixa de velocidade ascensional de 0,5 a 0,7 m h⁻¹ (considerando a vazão média de projeto), sendo o valor limite para reatores UASB tratando esgoto doméstico igual a 1 m h⁻¹. Na Tabela 20 são apresentados os valores de velocidade ascensional calculados para cada reator nos TDHs

aplicados neste estudo. Observa-se que as velocidades nos reatores RALFE e RALFO são bem inferiores aos limites recomendados, o que garante o impedimento da perda expressiva de sólidos do leito reacional. Com a aplicação de esgoto sanitário durante a Fase VII observou-se um aumento na concentração de sólidos suspensos no efluente, o que foi devido ao aporte de sólidos ao sistema proveniente do próprio esgoto.

5.5. Avaliação do conteúdo de biomassa nos reatores

Ao final da operação dos reatores foi avaliada a quantidade de biomassa presente no leito empacotado e ordenado. Na Tabela 25 e na Figura 61 podem ser visualizados os resultados obtidos. Constatou-se uma clara diferença no perfil de concentração de sólidos nos dois reatores. No leito empacotado observou-se uma concentração decrescente de biomassa aderida do ponto 2 para o ponto 4, o que é de se esperar pois a biomassa se concentra mais na parte inferior do leito. Já para o leito ordenado, ela apresentou uma maior concentração na parte mediana do leito, uma vez que a direção do fluxo é paralela à disposição do material suporte, facilitando a deposição de biomassa na porção com menor perturbação no fluxo ascensional.

Tabela 25 - Conteúdo de biomassa presente ao longo do perfil espacial dos reatores RALFE e RALFO

Parâmetro	RALFE		RALFO	
	SSF	SSV	SSF	SSV
Biomassa aderida P4 (mg g ⁻¹ EPU)	228	795	130	638
Biomassa aderida P3 (mg g ⁻¹ EPU)	242	786	270	1019
Biomassa aderida P2 (mg g ⁻¹ EPU)	261	873	234	881
Biomassa suspensa (mg)	622	3513	1028	6371
Biomassa total (mg)	4270	15920	2650	12770

Fonte: Autoria própria.

Figura 61 - Conteúdo de biomassa suspensa e aderida em gramas de sólidos suspensos voláteis e fixos no leito dos reatores RALFE e RALFO

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Pode-se observar também que no leito empacotado houve concentração significativamente superior de biomassa aderida comparada ao leito ordenado, já que houve maior quantidade de material suporte no RALFE (Tabela 7). Em contrapartida, a quantidade de biomassa em suspensão foi maior no RALFO, o que é devido a maior porosidade do leito ordenado.

Na Tabela 26 são apresentados os valores de produção estimada e arraste de sólidos dos reatores para cada fase operacional. Observa-se que a biomassa gerada no leito reacional é equivalente estatisticamente em termos médios à biomassa lavada do sistema pelo efluente ($PS = 0,17 \pm 0,11$ e $LS = 0,18 \pm 0,08$ gSST d⁻¹ no RALFE; $PS = 0,21 \pm 0,13$ e $LS = 0,21 \pm 0,12$ gSST d⁻¹ no RALFO). Dessa forma, assumiu-se que não houve acúmulo de biomassa no sistema. Portanto, para fins de cálculo dos valores de produção e rendimento de metano, bem como das constantes cinéticas específicas, apresentados anteriormente (Tabelas 16, 17, 22 e 23), foi levado em consideração o teor de SSV total de cada leito (Tabela 25).

Tabela 26 - Cálculo dos parâmetros relacionados a produção e arraste de biomassa, e à utilização de substrato (em termos de DQO) pela biomassa nos reatores RALFE e RALFO para as Fases de I a VII

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V	Fase VI	Fase VII	Média ± DP
TDH (h)	12	12	12	12	8	4	12	
DQO alimentação (mgDQO L ⁻¹)								
RALFE	275	258	266	296	286	330	393	301 ± 47
RALFO	275	258	268	291	283	329	427	304 ± 59
Carga de DQO aplicada (gDQO d ⁻¹)								
RALFE	1,1	1,1	1,1	1,2	1,8	4,1	1,6	1,7 ± 1,1
RALFO	1,4	1,3	1,3	1,5	2,1	4,9	2,1	2,1 ± 1,3
Produção estimada de sólidos no reator (gSST d ⁻¹) - Y = 0,1 kgSST kg ⁻¹ DQOaplicada								
RALFE	0,11	0,11	0,11	0,12	0,18	0,41	0,16	0,17 ± 0,11
RALFO	0,14	0,13	0,13	0,15	0,21	0,49	0,21	0,21 ± 0,13
SST efluente (mgSST L ⁻¹)								
RALFE	30	34	36	27	33	27	48	34 ± 7
RALFO	25	23	31	33	25	30	52	31 ± 10
Arraste de sólidos do sistema (gSST d ⁻¹)								
RALFE	0,13	0,14	0,15	0,11	0,21	0,34	0,20	0,18 ± 0,08
RALFO	0,13	0,12	0,16	0,17	0,19	0,45	0,26	0,21 ± 0,12
TRC - Tempo de retenção celular (d)								
RALFE	254	224	152	212	149	71	146	173 ± 62
RALFO	116	182	106	159	130	53	88	119 ± 43
COE - Carga orgânica específica (kgDQO kg ⁻¹ SSV d ⁻¹)								
RALFE	0,072	0,068	0,070	0,078	0,113	0,260	0,103	0,11 ± 0,07
RALFO	0,108	0,101	0,105	0,114	0,167	0,387	0,168	0,16 ± 0,10

Fonte: Autoria própria.

Além dos parâmetros mencionados foi possível também calcular os valores médios de tempo de retenção celular e carga orgânica específica com base nas Equações 16 a 17 em cada fase operacional (Tabela 26). Observa-se pelos resultados que o TRC obtido foi bastante elevado em todas as etapas operacionais, 173 ± 62 d no RALFE e 119 ± 43 d no RALFO, sendo bem superiores aos usualmente apresentados para sistemas usuais de lodos ativados e reatores UASB. O alto TRC também contribuiu para a biodegradação dos antibióticos, uma vez que quanto maior o TRC maior a diversidade de microrganismos e enzimas microbianas envolvidos na biotransformação dos fármacos (CLARA et al., 2005a). Lesjean et al. (2005), avaliando a remoção de alguns micropoluentes (carbamazepina, fenazona, propilfenazona, estrona, estradiol e etinilestradiol) e seus resíduos em MBR, constataram um aumento significativo na sua eliminação com o aumento do TRC de 8 para 26 d. Clara et al. (2005a) constataram que somente a partir de um TRC de 10 dias houve remoção significativa de ibuprofeno, benzaíbrato, bisfenol-A, estrona, estradiol e estriol em sistema de lodos ativados com nitrificação e desnitrificação. Suarez, Lema e Omil (2010) também encontraram efeito positivo

do aumento do TRC em processo aeróbio e anóxico na remoção de fluoexetina, naproxeno, citalopram e etinilestradiol. Stasinakis et al. (2010) obtiveram maior remoção de nonilfenol, triclosan e bisfenol-A no processo de lodos ativados quando aumentaram o SRT de 3 para 20 d.

De acordo com Yuan, Guo e Yang (2015) a carga orgânica específica também poderia influenciar na remoção de antibióticos. Segundo os autores, uma maior COE pode aumentar a população de bactérias resistentes a antibióticos, bem como promover a lavagem de bactérias que degradam os antimicrobianos. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho são inferiores à faixa limite para digestão anaeróbia apresentada por Chernicharo (2015) - 0,3 a 0,4 kgDQO kg⁻¹SSV d⁻¹, a partir da qual poderia haver algum impacto sobre o processo. Dessa forma, considerando os altos valores de TRC, assumiu-se que a COE não interferiu na remoção dos fármacos e no possível arraste dos microrganismos que degradam os antibióticos, com uma ressalva para a Fase VI, em que foram observados os maiores valores de COE, o que pode ter contribuído para o menor desempenho na remoção dos fármacos nessa fase.

Comparando-se os reatores, observou-se maiores valores de TRC e menor COE no RALFE, uma vez que o conteúdo de biomassa no leito empacotado foi superior ao leito ordenado. No entanto, constatou-se que essas diferenças não foram significativas para o desempenho geral dos biorreatores na remoção de DQO e antibióticos, uma vez que, conforme discutido anteriormente, este foi similar para os dois reatores.

5.6. Avaliação do mecanismo de sorção sobre a eliminação de SMX e CIP

Na Figura 62 encontram-se os resultados referentes ao ensaio de adsorção de SMX e CIP em reatores diferenciais. Como pode ser observado não foi constatado remoção significativa dos antibióticos (remoção nula para SMX e 9 % de remoção para CIP) para as condições do ensaio. No entanto, salienta-se que o ensaio realizado foi de curta duração e apresentou uma velocidade ascensional bem superior (aproximadamente 0,3 m h⁻¹) ao empregado nos reatores, dado pelo reduzido TDH (em torno de 30 segundos) aplicado nos reatores diferenciais, uma vez que as bombas peristálticas utilizadas para o ensaio não conseguiam atingir vazões muito baixas. O reduzido tempo de contato antibiótico-biofilme pode ter impedido a potencial sorção do fármaco na biomassa. Dessa forma, por meio desse ensaio preliminar não foi possível determinar se o mecanismo de sorção influenciava significativamente na remoção dos compostos.

Figura 62 - Perfil temporal de SMX e CIP obtido do ensaio de adsorção em reatores diferenciais

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 27 estão os resultados referentes aos valores de CIP detectados na biomassa ao longo do leito reacional dos reatores ao final do período operacional. Observa-se que os valores obtidos corroboram a assertiva de que a remoção de CIP é influenciada pelo mecanismo de sorção. Por outro lado, não foi detectado SMX em nenhuma das amostras analisadas, o que denota que a remoção da sulfonamida é totalmente devida a biodegradação cometabólica, como pressuposto anteriormente.

Tabela 27 - Valores de CIP detectados nas amostras de biomassa do leito fixo dos reatores e valores de $\log K_D$ estimados para cada amostra

Parâmetro	RALFE		RALFO	
	CIP (ng g ⁻¹ SS)	$\log K_D$ (L kg ⁻¹ SS)	CIP (ng g ⁻¹ SS)	$\log K_D$ (L kg ⁻¹ SS)
Biomassa Aderida P4	10,4	2,46	6,5	2,19
Biomassa Aderida P3	12,6	2,54	6,6	2,20
Biomassa Aderida P2	20,2	2,75	7,2	2,24
Biomassa Suspensa	6,9	2,29	10,6	2,40
Biomassa Total	21,3	2,77	17,4	2,62

Fonte: Autoria própria.

Gonzalez-Gil et al. (2018) avaliaram o potencial de sorção de vinte micropoluentes orgânicos em condição anaeróbia metanogênica, e dividiram os compostos em três grupos de acordo com o coeficiente de partição obtido – compostos com alta capacidade de sorção ($\log K_D > 2,5$); compostos com sorção moderada ($\log K_D$ entre 2 e 2,5); e compostos com baixa ou nula capacidade de sorção ($\log K_D < 2$), que foi o caso do SMX. Carballa et al. (2008) determinaram o coeficiente K_D para o SMX em digestor de lodo anaeróbio e obtiveram a faixa

de 0,77 a 1,79 para $\log K_D$. Göbel et al. (2005) obtiveram para SMX em lodo primário e secundário do sistema de lodos ativados os valores de 2,6 e 2,4, respectivamente. Joss et al. (2005) obtiveram para SMX os valores de 2,6, 2,4 e 2,4 para lodo primário, lodo ativado secundário e lodo de MBR, respectivamente. Alvarino et al. (2014, 2016b) avaliaram comparativamente a sorção e a biodegradação de vários micropoluentes orgânicos em reatores UASB e lodos ativados e observaram sorção nula ou baixa sorção para SMX em ambos sistemas – $\log K_D$ de 0 a 2,1 no UASB e de 1,9 a 2,0 no reator aeróbio.

Li e Zhang (2010), estudando os mecanismos de remoção de sulfonamidas e fluoroquinolonas em lodos ativados, obtiveram a faixa de $\log K_D$ entre 3,3 e 3,7 para as fluoroquinolonas, sendo a remoção de CIP fortemente influenciada pelo mecanismo de sorção. Lindberg et al. (2006), pesquisando sobre os antibióticos nas estações de tratamento da Suíça, obtiveram que aproximadamente 80 % da CIP afluente às estações fica sorvida no lodo. Conforme observado na Figura 8, a ciprofloxacina, para a faixa de pH usual de esgoto sanitário (6 a 8), apresenta um grupamento amino carregado positivamente, o que pode contribuir para a adsorção por meio de interações eletrostáticas com o lodo, carregado negativamente (STEVENSON-GARMON et al., 2011). Polesel et al. (2015) avaliaram a sorção de CIP em lodos ativados sob diferentes condições de pH e obtiveram que a maior sorção de CIP ocorre no ponto isoelétrico (pH = 7,4), atingindo $\log K_D$ de 4,1.

Levando em consideração a quantidade de CIP sorvida na biomassa ($\text{ng g}^{-1}\text{SST}$ – Tabela 27), e considerando que a biomassa gerada é equivalente à biomassa lavada do sistema, pode-se calcular a contribuição (em %) da sorção para a eliminação total de CIP dos reatores, conforme apresentado na Equação 23. Assim, na Tabela 28 são apresentados os valores calculados para cada fase. Constatou-se que a contribuição da sorção para a eliminação total da CIP dos reatores é irrisória (menos que 0,5 %), uma vez que a biomassa gerada e lavada do sistema é pequena, bem como a concentração afluente de CIP. Assim, apesar do mecanismo de sorção influenciar na remoção da CIP, esta foi devida praticamente à biotransformação. De fato, no modelo proposto por Oliveira, Santos-Neto e Zaiat (2016), avaliando a remoção anaeróbia de sulfametazina, os autores concluíram que para pequenas concentrações afluentes do fármaco, o mecanismo de adsorção possui pouca interferência na sua eliminação total. Ressalta-se também a vantagem neste caso da aplicação do leito fixo para o tratamento, que mantém alto TRC sem arraste expressivo de biomassa, garantindo que a CIP adsorvida não seja lavada por arraste de sólidos suspensos no efluente.

Tabela 28 - Concentração efluente de CIP relacionada a sorção (C_{sor}) e contribuição da sorção na eliminação total da CIP do sistema

Reator	Fase III	Fase IV	Fase V	Fase VI	Fase VII	Média $\pm$ DP
C_{sor} (ngCIP L ⁻¹)						
RALFE	0,77	0,58	0,70	0,58	1,02	0,73 $\pm$ 0,18
RALFO	0,54	0,57	0,44	0,52	0,90	0,60 $\pm$ 0,18
Sorção CIP (%)						
RALFE	0,26	0,14	0,15	0,12	0,46	0,23 $\pm$ 0,14
RALFO	0,19	0,13	0,11	0,10	0,38	0,18 $\pm$ 0,12

Fonte: Autoria própria.

5.7. Avaliação da constante de biotransformação - k_{bio}

Considerando que a eliminação de SMX e CIP foi totalmente (ou quase totalmente no caso da CIP) devida a biotransformação, foi possível calcular os valores das constantes de biotransformação em cada fase operacional, baseando-se nas constantes cinéticas de remoção aparentes obtidas por meio dos perfis espaciais dos reatores. Os resultados encontram-se na Tabela 29.

Tabela 29 - Valores da constante de biotransformação k_{bio} (L g⁻¹SSV d⁻¹) de SMX e CIP para as Fases de II a VII

Reator	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V	Fase VI	Fase VII	Média $\pm$ DP
SMX							
RALFE	1,670		2,206	1,985	3,151	0,693	1,941 $\pm$ 0,890
RALFO	2,547		1,698	2,311	4,810	1,698	2,613 $\pm$ 1,284
CIP							
RALFE		2,773	2,332	3,151	2,994	1,166	2,483 $\pm$ 0,798
RALFO		3,254	2,452	2,735	7,876	1,745	3,613 $\pm$ 2,445

Fonte: Autoria própria.

De maneira geral, comparando-se os dois reatores os valores de k_{bio} foram superiores no RALFO devido a menor quantidade de biomassa comparado ao leito empacotado, indicando o melhor desempenho do leito ordenado na biotransformação dos compostos. Constatou-se também uma queda nos valores de k_{bio} aplicando esgoto sanitário, o que certifica que a matriz complexa do esgoto interferiu na capacidade de biodegradação dos reatores.

Alvarino et al. (2016b) avaliaram a remoção de vários micropoluentes orgânicos em UASB e MBR aeróbio e obtiveram k_{bio} para SMX de 0,8 e 2 L g⁻¹SSV d⁻¹, respectivamente. Já comparando os valores entre UASB e lodos ativados, Alvarino et al. (2014) obtiveram 0,36 e faixa de 0,7 a 9 L g⁻¹SSV d⁻¹, respectivamente. Comparando-se, portanto, os valores de k_{bio}

entre sistema anaeróbio e aeróbio, observa-se geralmente, maior constante de biodegradação em sistema aeróbio devida a menor concentração de SSV na biomassa aeróbia. Alguns estudos têm relatado que o SMX não é muito bem removido no processo de lodos ativados. De fato, Alvarino et al. (2014, 2016b) observaram biodegradação de SMX bem superior no processo anaeróbio (por volta de 90 %) comparado ao aeróbio (por volta de 40 %).

Abegglen et al. (2009) obtiveram k_{bio} de $0,2 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$ para SMX em MBR aeróbio / anóxico, enquanto que Suarez, Lema e Omil (2010), em lodos ativados, obtiveram k_{bio} de $0,3 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$. Li e Zhang (2010) alcançaram k_{bio} de $0,05$ e $0,07 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$ para SMX e CIP, respectivamente, em lodos ativados. Já Min et al. (2018), também em lodos ativados, alcançaram k_{bio} de $0,14$ e $0,18 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$ para SMX e CIP, respectivamente. Em condição metanogênica, Gonzalez-Gil et al. (2018) obtiveram $0,54 \pm 0,26 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$ de k_{bio} para SMX. Os maiores valores de k_{bio} encontrados neste estudo em comparação com a literatura demonstram o potencial de biodegradação dos reatores anaeróbios de leito fixo com espuma de poliuretano para remoção de micropoluentes orgânicos como os antibióticos. Ressalta-se que ainda não foram apresentados valores de k_{bio} para CIP em sistemas anaeróbios.

5.8. Análise microbiológica dos reatores

Na Figura 63 são apresentados os resultados referentes às unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e abundância relativa (AR) para as amostras de inóculo, e para os reatores alimentados com esgoto lab-made (Fase VI) e com esgoto doméstico (Fase VII), considerando-se os domínios Bacteria e Archaea. Constatou-se que a população de Archaea foi favorecida (maior AR e OTUs) nos reatores com aplicação de esgoto lab-made, quando comparado ao inóculo. Entretanto, quando foi aplicado esgoto doméstico, como substrato de alimentação, houve uma queda abrupta na população de arqueias, sobretudo metanogênicas, o que possivelmente explica o menor desempenho dos reatores na Fase VII no que tange à remoção de DQO e produção de metano, conforme apresentado anteriormente.

Figura 63 - Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e abundância relativa (AR) para os domínios Bacteria e Archaea nas amostras de inóculo, e nos reatores alimentados com esgoto lab-made e com esgoto doméstico

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 30 são apresentados os índices de riqueza (Chao-1), dominância (D) e diversidade (Shannon – H) das populações microbianas para as amostras analisadas. Observa-se uma diminuição da diversidade e consequente aumento de dominância e riqueza para as amostras dos reatores com esgoto lab-made ou doméstico em comparação ao inóculo. Vale ressaltar que o inóculo utilizado é proveniente de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves. A medida que este inóculo granular em avançado estágio de formação é macerado e colocado no reator, sob operação com alimentação de um substrato menos complexo e com menor carga orgânica (esgoto lab-made adaptado de Torres (1992) ou esgoto doméstico), ocorre a seleção de microrganismos para se adaptar àquela nova condição, com o consequente aumento do índice de dominância e diminuição do índice de diversidade de Shannon.

Tabela 30 - Índices de riqueza, dominância e diversidade de espécies para as amostras de inóculo, e reatores alimentados com esgoto lab-made e com esgoto doméstico

Índices	Inóculo	RALFO Esgoto Lab-made	RALFE Esgoto Lab-made	RALFE Esgoto Doméstico
Dominância - D	0,040	0,044	0,056	0,058
Diversidade - Shannon - H	4,426	4,243	4,012	4,348
Riqueza - Chao-1	1645	1743	1751	1662

Fonte: Autoria própria.

Comparando-se os reatores operados com esgoto lab-made, observa-se índices de riqueza (Chao-1) similares, porém menor diversidade (Shannon) e maior dominância (D) para o RALFE, o que também pode ter contribuído para a menor remoção de DQO e SMX na Fase VI, observada para este reator. De fato, observou-se uma menor abundância relativa e número total de OTUs de arqueias no RALFE, possivelmente levando à menor produção e rendimento específicos de metano neste reator, durante a Fase VI (Tabela 22).

Na Figura 64 estão representados todos os gêneros de Bacteria e Archaea encontrados com abundância relativa $> 1\%$ em pelo menos uma das amostras, considerando o número total de OTUs. Na Figura 65, visualiza-se a representação esquemática da diferença de abundância relativa para os gêneros dos domínios Bacteria e Archaea nas amostras dos reatores RALFE e RALFO operados com esgoto lab-made. Observou-se que, em termos de abundância relativa para ambos os domínios, os reatores apresentaram praticamente a mesma composição microbiana, porém constatou-se que no RALFO houve maior AR do gênero *Mathanolinea* (Domínio Archaea) e no RALFE maior AR do gênero *Lactivibrio* (Domínio Bacteria). Para os demais gêneros encontrados, não houve diferença significativa entre os reatores. Isso evidencia que as configurações diferentes de leito não selecionaram comunidades microbianas distintas. No entanto, ao se comparar somente a AR de arqueias metanogênicas em relação ao total de OTUs de arqueias (Figura 66), observou-se maior diversidade no RALFO, enquanto o RALFE apresentou maior dominância do gênero *Methanobacterium* (AR = 75 %). Essa menor diversidade de metanogênicas no RALFE também pode ter contribuído para o menor desempenho deste reator na remoção de matéria orgânica e produção específica de metano durante a Fase VI.

Figura 64 - Abundância relativa de gêneros para os domínios Bacteria e Archaea encontrados nas amostras de inóculo, e nos reatores alimentados com esgoto lab-made e esgoto doméstico. Foram selecionados somente os gêneros com AR > 1 % em pelo menos uma das amostras

Fonte: Autoria própria.

Figura 65 - Comparação entre as amostras do RALFE e RALFO alimentado com esgoto lab-made para os gêneros dos domínios Bactéria e Archaea. Foram selecionados somente os gêneros com AR > 1 %. O gênero destacado em verde corresponde àquele que a AR foi significativamente maior no RALFO e o destacado em laranja àquele que a AR foi significativamente maior no RALFE. Para os demais gêneros (destacados em preto – Tabela 31) não houve diferença significativa na AR das amostras analisadas

Fonte: Autoria própria.

Tabela 31 - Gêneros dos domínios Bacteria e Archaea apontados nas Figuras 65 e 67

Letra	Gênero
A	<i>Cytophaga</i>
B	<i>Bacteroides</i>
C	<i>Anaerophaga</i>
D	<i>Aminomonas</i>
E	<i>Methanosaeta</i>
F	<i>Methanolinea</i>
G	<i>Syntrophus</i>
H	<i>Syntrophorhabdus</i>
I	<i>Syntrophobacter</i>
J	<i>Synergistes</i>
K	<i>Planctomyces</i>
L	<i>Owenweeksia</i>
M	<i>Ornatilinea</i>
N	<i>Nitrosovibrio</i>
O	<i>Acidobacterium</i>
P	<i>Romboutsia</i>
Q	<i>Methanoregula</i>
R	<i>Treponema</i>
S	<i>Thermanaerovibrio</i>

Fonte: Autoria própria.

Figura 66 - Abundância relativa de arqueias metanogênicas encontrados nas amostras de inóculo, e nos reatores alimentados com esgoto lab-made e com esgoto doméstico

Fonte: Autoria própria.

Com relação ao reator operado com esgoto doméstico, observou-se um menor índice de riqueza (Chao-1), e maiores índices de dominância e diversidade comparado aos reatores operados com esgoto lab-made, o que também foi acompanhado pelo menor número total de sequências (OTUs – Figura 63). Isso possivelmente foi devido à matriz mais complexa do esgoto (comparado ao esgoto lab-made), que possui uma variedade de outros compostos xenobióticos, bem como microrganismos que podem ter competido com a comunidade microbiana previamente estabelecida no biofilme do reator.

Na Figura 67 são comparados as AR dos gêneros de Bactéria e Archaea no RALFE operado com esgoto lab-made e esgoto doméstico. Constatou-se maior AR para os gêneros *Methanobacterium*, *Bacillus* e *Clostridium* no RALFE operado com esgoto lab-made, e maior AR para os gêneros *Lactivibrio*, *Treponema* e *Thermoanaerophaga* no RALFE operado com esgoto sanitário. Além disso, considerando somente os gêneros de arqueias metanogênicas, apresentados na Figura 66, observou-se maior AR de *Methanobacterium* (hidrogenotrófica) nos reatores com esgoto lab-made e maior AR de *Methanosaeta* (acetoclástica) no reator com esgoto sanitário.

Cetecioglu et al. (2016) constataram que a degradação anaeróbia de SMX está relacionada a homoacetogênese acoplada a metanogênese hidrogenotrófica, sendo que esses autores encontraram dominância dos gêneros *Clostridium* e *Methanobacterium* associados a remoção de SMX, e que as metanogênicas acetoclásticas não desempenharam um papel importante na eliminação do fármaco. Esse estudo corrobora o maior desempenho na remoção de SMX encontrado para o RALFE tratando esgoto lab-made em comparação ao esgoto doméstico.

Possivelmente, nos reatores tratando esgoto lab-made houve um maior equilíbrio entre a fermentação pelas bactérias produtoras de $H_{2(g)}$ e o consumo deste na metanogênese hidrogenotrófica, enquanto no reator tratando esgoto doméstico, houve um desbalanceamento entre produção e consumo de $H_{2(g)}$, dado pela menor AR de arqueias hidrogenotróficas. Dessa forma, a degradação de matéria orgânica e produção de metano foi favorecida nos reatores tratando esgoto lab-made. Além disso, estudos recentes (MIRAN et al., 2018; FAN; YANG; CHANG, 2019; FENG et al., 2019) têm apontado a presença de *Bacillus* e *Clostridium* associados a biodegradação de SMX e CIP, o que também pode ter favorecido o desempenho na remoção dos fármacos dos reatores tratando esgoto lab-made. A AR de *Clostridium* e *Bacillus* foi de 15,3 e 9,8 %, respectivamente, para esgoto lab-made, enquanto para esgoto doméstico, foi observada AR de 5,4 e 2,9 %, respectivamente.

Figura 67 - Comparação entre as amostras do RALFE alimentado com esgoto lab-made e esgoto doméstico para os gêneros dos domínios Bacteria e Archaea. Foram selecionados somente os gêneros com AR > 1 %. Os gêneros destacados em verde correspondem àqueles que AR foi significativamente maior no RALFE tratando esgoto lab-made e os destacados em laranja àqueles que a AR foi significativamente maior no RALFE tratando esgoto doméstico. Para os demais gêneros (letras A até O – Tabela 31) não houve diferença significativa na AR das amostras analisadas

Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2019).

Para a análise de microscopia, ao final da operação com esgoto lab-made (Fase VI), foram retiradas amostras de biomassa inoculada ao longo do perfil espacial do reator de leito empacotado. Após a Fase VII, amostras de biomassa foram retiradas de ambos reatores. Nas

Figuras 68, 69 e 70 são apresentadas as principais morfologias encontradas em cada amostra por meio da análise de microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência.

Foram observadas várias morfologias presentes nas amostras analisadas – bacilos de diversas dimensões, cocos, cocobacilos, diplococos, bacilos coloniais, cocobacilos coloniais, espiroquetas, vibrios, esporos ou células em processo de esporulação, bacilos fluorescentes, cocos fluorescentes, e até mesmo protozoário flagelado.

Com relação as arqueias metanogênicas foi possível observar formas semelhantes ao gênero *Methanosaeta* e *Mathanosaeta* com vacúolo gasoso, notadamente nas amostras com esgoto doméstico, o que foi confirmado pela análise de biologia molecular (maior AR de *Mathanosaeta* comparado às amostras com esgoto lab-made – Figura 66). A presença de vacúolos gasosos em *Methanosaeta* foi apresentada anteriormente nos estudos de Zinder et al. (1984) e Zinder, Anguish e Lobo (1987). A espécie de *Methanosaeta* encontrada nas amostras e que apresentou uma significativa AR foi a *Methanosaeta concilii*. Segundo Patell e Sprott (1990), o ácido acético é a única fonte de energia dessa espécie, que apresenta crescimento numa faixa estreita de pH (6,6 a 7,8), apresentando maior sensibilidade à condições ácidas comparado a *Methanosarcina*, por exemplo, outro gênero de acetoclástica frequentemente encontrado na digestão anaeróbia.

As morfologias de bacilos, cocos e arranjos de células observadas nas imagens de microscopia de fluorescência também podem estar relacionadas à presença de arqueias metanogênicas. Bacilos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* foram encontrados por Zinder et al. (1984). Dentre as espécies do gênero *Methanobacterium* foram identificadas nas amostras *Methanobacterium subterraneum*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium aarhusense* e *Methanobacterium flexile*, que são arqueias hidrogenotróficas em forma de bacilos, que produzem metano a partir de $H_{2(g)}$ / $CO_{2(g)}$ e formiato, e que fluorescem no comprimento de onda de 420 nm (SVETLANA; MACARIO; KARSTEN, 1998; SHLIMON et al., 2004; ZHU; LIU; DONG, 2011; BATTUMUR; YOON; KIM, 2016). A espécie *Methanobacterium subterraneum* foi descrita por Svetlana, Macario e Karsten (1998) como resistente a vários antibióticos, sendo o ácido nalidíxico um deles, que é o precursor da ciprofloxacina. Outras formas de bacilos fluorescentes encontrados nas amostras podem também estar relacionados às arqueias metanogênicas hidrogenotróficas - *Methanobrevibacter*, *Methanolinea* e *Methanospirillum*.

Figura 68 - Morfologias encontradas na microscopia de fluorescência e contraste de fase para a biomassa do RALFE alimentado com esgoto lab-made (Fase VI). Organismos semelhantes a *Methanosaeta* com vacúolo (a); *Methanosaeta* (b); bacilos (c); bacilos delgados (d); cocos (e); cocobacilos (f); esporos ou células em processo de esporulação (g); vibrios (h); bacilos coloniais (i); cocobacilos coloniais (j); diplococo (k); espiroqueta (l); protozoário flagelado (m); cocos fluorescentes (n); bacilos fluorescentes (o); arranjos de células fluorescentes (p).

Fonte: Autoria própria.

Figura 69 - Morfologias encontradas na microscopia de fluorescência e contraste de fase para a biomassa do RALFE alimentado com esgoto doméstico (Fase VII). Organismos semelhantes a *Methanosaeta* com vacúolo (a); *Methanosaeta* (b); bacilos (c); bacilos delgados (d); cocos (e); cocobacilos (f); esporos ou células em processo de esporulação (g); vibrios (h); bacilos coloniais (i); cocobacilos coloniais (j); espiroqueta (l); cocos fluorescentes (n); bacilos fluorescentes (o); arranjos de células fluorescentes (p).

Fonte: Autoria própria.

Figura 70 - Morfologias encontradas na microscopia de fluorescência e contraste de fase para a biomassa do RALFO alimentado com esgoto doméstico (Fase VII). Organismos semelhantes a *Methanosaeta* com vacúolo (a); *Methanosaeta* (b); bacilos (c); bacilos delgados (d); cocos (e); cocobacilos (f); esporos ou células em processo de esporulação (g); vibrios (h); bacilos coloniais (i); espiroqueta (l); cocos fluorescentes (n); bacilos fluorescentes (o); arranjos de células fluorescentes (p).

Fonte: Autoria própria.

Uma espécie de *Methanolinea* encontrada nas amostras foi a *Methanolinea mesófila* que apresenta a forma de bacilo delgado, utiliza $H_{2(g)}/CO_{2(g)}$ e formiato para produção de metano, sendo o acetato requerido para o seu crescimento, e cresce na faixa de pH 6,5 a 7,4 (SAKAI et al., 2012). Para o gênero de *Methanobrevibacter*, a espécie *Methanobrevibacter smithii* foi identificada, sendo sua presença encontrada no intestino humano, estando associada a remoção por via metanogênica e não-metanogênica de vários produtos da fermentação anaeróbia (SAMUEL et al., 2007).

Para o gênero *Methanoregula*, foi encontrada a espécie *Methanoregula boonei*, uma arqueia hidrogenotrófica que pode se apresentar na forma de bacilos ou cocos irregulares, sendo apresentada anteriormente como não fluorescente, indicando baixas ou nenhuma concentração do cofator F_{420} (BRÄUER et al., 2011). A espécie é considerada ácido-tolerante (crescimento ótimo em pH 5,1), sendo sua presença associada, portanto, às bactérias fermentativas acidogênicas.

Considerando as formas de cocos fluorescentes encontradas nas amostras, alguns gêneros de arqueias hidrogenotróficas poderiam estar associados, como *Methanosphaerula* e *Methanomassiliicoccus*. Para o gênero *Methanosphaerula*, foi encontrada a espécie *Methanosphaerula palustres*, uma arqueia hidrogenotrófica na forma de cocos e diplococos, autofluorescente, e que cresce na faixa de temperatura entre 14 e 35 °C, e de pH entre 4,8 e 6,4 (CADILLO-QUIROZ; YAVITT; ZINDER, 2009). Os arranjos de células fluorescentes encontrados nas amostras poderiam ser agrupamentos de bacilos ou cocos fluorescentes. No entanto, observa-se grande semelhança, sobretudo para as amostras da Figuras 68 e 70, com a *Methanosarcina barkeri*, uma metanogênica versátil que pode produzir metano a partir do acetato ou do hidrogênio, e formar aglomerados de células grandes e esféricas (DODDEMA; VOGELS, 1978; BALCH et al., 1979; LOVLEY, 2018). Porém, ressalta-se que espécies do gênero *Methanosarcina* não foram encontradas nas amostras analisadas por biologia molecular.

Com relação ao domínio Bacteria, as formas de espiroquetas encontradas poderiam estar associadas à presença do gênero *Treponema*. Uma espécie encontrada nas amostras foi a *Treponema primitia*, que é uma bactéria homoacetogênica, e que atua diretamente na formação do acetato (GRABER; BREZNAK, 2004). Ressalta-se que a AR do gênero *Treponema* no reator alimentado com esgoto doméstico foi significativamente maior do que nos reatores alimentados com esgoto lab-made, o que corrobora também a menor AR de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e maior AR para as acetoclásticas, notadamente *Methanosaeta*, nos reatores com esgoto doméstico (Figuras 66, 69 e 70).

Os vibrios encontrados podem estar associados à presença do gênero *Lactivibrio* que foi abundante em todas as amostras, com destaque para o esgoto doméstico. Pela análise de biologia molecular foi possível identificar a espécie *Lactivibrio alcoholicus*, uma bactéria mesofílica (crescimento entre 25 e 40 °C), anaeróbia obrigatória, degradadora de aminoácidos, lactato, carboidratos e álcoois para gerar como principais produtos finais acetato e hidrogênio, podendo estar, portanto, em cocultura com metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas (QIU et al., 2014).

Os gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, que se destacaram nas amostras, notadamente naquelas com efluente lab-made, podem estar associados às morfologias bacilares e à presença de endósporos ou células em processo de esporulação, que é típico nesses gêneros de bactérias. Dentre as espécies de *Clostridium* que apareceram, destacou-se *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, uma bactéria anaeróbia, formadora de esporos, e produtora de hidrogênio e solventes, como butanol, etanol e acetona (POEHLEIN et al., 2014). Outras espécies de *Clostridium* identificadas foram *Clostridium tunisiense* e *Clostridium thiosulfatireducens*, que são bactérias formadoras de esporos e estão associados a redução de tiosulfato e enxofre elementar para sulfeto nos reatores anaeróbios (HERNANDEZ-EUGENIO et al., 2002; THABET et al., 2004).

Outros gêneros de bactérias identificadas nas amostras com AR > 1 % e que poderiam estar associados às formas bacilares ou cocobacilares encontradas foram *Cytophaga*, *Acidobacterium*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus*, *Syntrophorhabdus*, *Geobacter*, *Synergistes*, *Bacteroides*, *Aminobacterium*, *Owenweeksia* e *Aminomonas*.

A presença do gênero *Syntrophorhabdus*, e considerando a espécie identificada *Syntrophorhabdus aromaticivorans*, apresenta a morfologia de cocobacilo, sendo que essa espécie já foi relatada como capaz de degradar compostos aromáticos em associação sintrófica obrigatória com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (QIU et al., 2008). Dessa forma, a presença desses microrganismos poderia estar associada diretamente à biodegradação cometabólica dos antibióticos SMX e CIP, que apresentam anéis aromáticos em sua estrutura molecular.

Dentre as espécies do gênero *Syntrophobacter*, as que foram identificadas nas amostras deste estudo - *Syntrophobacter sulfatereducens*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophobacter wolinii* e *Syntrophobacter pfennigii*, estão associadas à degradação de propionato a acetato e CO_{2(g)}, na presença de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (BOONE; BRYANT, 1980; WALLRABENSTEIN; HAUSCHILD; SCHINK, 1995; HARMSSEN et al., 1998; CHEN; LIU; DONG, 2005). Outra associação sintrófica com arqueias

hidrogenotróficas / acetoclásticas pode estar presente nos reatores pela presença das bactérias do gênero *Syntrophus*, sendo que foi possível identificar duas espécies - *Syntrophus gentianae* e *Syntrophus aciditrophicus*, que participam na degradação anaeróbia de AGV e ácido benzoico, produzindo acetato e $H_{2(g)}$ (SCHÖCKE; SCHINK, 1997; JACKSON et al., 1999). Ressalta-se que poderia haver também neste caso um cometabolismo enzimático na degradação dos fármacos SMX e CIP mediado por essas bactérias. Um gênero frequentemente associado à degradação de benzeno em condição anaeróbia é o *Geobacter*, sendo que neste estudo foi identificado a espécie *Geobacter sulfurreducens*, que também está envolvida na redução de sulfato e produção de $H_{2(g)}$ e acetato (LOVLEY et al., 2011).

A presença de bactérias do gênero *Synergistes* nas amostras evidenciam que pode ter ocorrido uma competição por substrato com as arqueias acetoclásticas, uma vez que essas bactérias oxidam o acetato na presença das arqueias hidrogenotróficas (ITO et al., 2011).

As bactérias do gênero *Bacteroides* são microrganismos fermentativos, podendo atuar diretamente na hidrólise e acidogênese de carboidratos para geração de AGV (WEXLER, 2007). As bactérias do gênero *Aminobacterium* foram associadas à degradação de aminoácidos para produção de hidrogênio, sendo que algumas espécies desse gênero já foram associadas em cocultura com a metanogênica hidrogenotrófica *Methanobacterium formicicum* (BAENA et al., 1998). Da mesma forma, a espécie *Aminomonas paucivorans*, encontrada em todas as amostras apresenta o mesmo metabolismo, tendo como produtos finais acetato, formiato, hidrogênio, dióxido de carbono e traços de propionato (BAENA et al., 1999). As bactérias do gênero *Owenweeksia* poderiam estar associadas a hidrólise do amido (LAU et al., 2005).

Com relação ao gênero *Thermanaerovibrio*, foi possível identificar duas espécies *Thermanaerovibrio acidaminovorans* e *Thermanaerovibrio velox*, ambas relacionadas à produção de $H_{2(g)}$ e acetato no meio, sendo a segunda também capaz de produzir lactato e etanol (ZAVARZINA et al., 2000; CHOVIATIA et al., 2009).

5.9. Identificação dos produtos de degradação de SMX e CIP

Por meio dos ensaios em batelada em alta concentração de SMX e CIP (5 mg L^{-1}), e comparando-se as amostras biodegradadas com as amostras controle, foi possível identificar alguns PDs, apresentados na Tabela 32. A Figura 71 mostra os cromatogramas com os íons extraídos de SMX no tempo inicial e para cada subproduto identificado após 72 h.

Tabela 32 - Produtos de degradação identificados por LC-QTOF (ESI (+) MS) para SMX e CIP nos ensaios em batelada

Composto original	Produto de Degradação	
	Fórmula Molecular proposta	m/z [M+H] ⁺
SMX	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ S ⁺	254,0585
SMX	C ₁₀ H ₁₄ N ₃ O ₃ S ⁺	256,0747
SMX	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ⁺	270,0940
CIP	C ₉ H ₆ NO ₂ ⁻	161,1100
CIP	C ₁₄ H ₁₂ FN ₂ O ₃ ⁻	276,1735
CIP	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₂	316,2154

Fonte: Autoria própria.

Figura 71 - Cromatograma (íon extraído) dos intermediários m/z 254, 256 e 270 obtidos a partir de análises realizadas por LC-QTOF (ESI (+) MS). Biodegradação do sulfametoxazol após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 72 são mostrados os espectros de MS/MS obtidos para cada PD identificado, de forma a propor as estruturas moleculares para cada composto, bem como para os fragmentos obtidos no experimento de MS/MS.

Figura 72 - Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC-QqToF (ESI (+) MS/MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura dos intermediários de m/z 254 (a), m/z 256 (b) e m/z 270 (c)

Fonte: Autoria própria.

Para o SMX, foram identificados três subprodutos da biodegradação anaeróbia do fármaco - o de m/z 254, que é isômero de SMX; o de m/z 256, com quebra do anel isoxazol; e o subproduto hidroxilado de m/z 270. Todos os produtos identificados oriundos da

biodegradação do sulfametoxazol apresentaram mudanças no anel isoxazol e não foram observadas mudanças no anel anilina. Jia et al. (2017) também identificaram como PD de SMX o composto de m/z 256, em condição anaeróbia de redução de sulfato e ainda encontraram um PD derivado do composto de m/z 256, que foi o PD de m/z 173, dado pela quebra total do anel isoxazol. Esses autores também encontraram outros PDs do SMX, relacionados à metilação e hidroxilação do anel isoxazol. Outros autores encontraram alterações no anel anilina. Poirier-Larabie, Segura e Gagnon (2016) observaram em condição aeróbia e anaeróbia perda do grupamento amino do anel benzeno. Já Müller et al. (2013) constataram substituição do grupo amino pelo grupo hidroxila. O PD de m/z 270 proposto não foi identificado em estudos prévios da literatura.

As Figuras 73 e 74 mostram, respectivamente, os cromatogramas com os íons extraídos do composto no tempo inicial e para cada subproduto de CIP identificado após 24, 48 e 72 h, e os espectros de MS/MS realizados para confirmar as estruturas propostas para cada PD detectado.

Figura 73 - Cromatograma (íon extraído) dos intermediários m/z 276, 161 e 316 obtidos a partir de análises realizadas por LC-QTOF (ESI (+) MS). Biodegradação de CIP após 24, 48 e 72 horas de exposição ao reator anaeróbio

Fonte: Autoria própria.

Figura 74 - Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC-QqToF (ESI (+) MS/MS) após 24, 48 e 72 horas de exposição ao reator anaeróbico para identificação da estrutura dos intermediários de m/z 276 (a), m/z 161 (b) e m/z 316 (c)

Fonte: Autoria própria.

Para a ciprofloxacina, os PDs identificados mostraram clivagem no anel piperazina (m/z 161, 276), no grupo ciclopropil e na ligação C–F (m/z 161). Já o produto de m/z 316 mostrou quebra no grupo carboxílico. Pan et al. (2018) identificaram alguns PDs de CIP por cultura pura de *Thermus sp.* isolada de um lodo farmacêutico e previamente adaptada à fluoroquinolona. Os autores também encontraram quebra ou alteração no anel piperazina (compostos de m/z de 190, 223, 263, 306, 334, 348 e 360), quebra do grupo ciclopropil (compostos de m/z de 190, 223), e quebra da ligação C–F (m/z 190). Jia et al. (2018), em condição anaeróbia sulfetogênica, também constataram quebra do anel piperazina (m/z 306, 263), e identificaram hidroxilação da molécula (m/z 348), substituição do átomo de F pelo grupo hidroxila (m/z = 330), e quebra do grupo carboxílico e substituição por –OH (m/z = 304). Já nos estudos de Liu et al. (2013), em condição anóxica, não foram observadas clivagens na molécula, apenas alterações no anel piperazina, com a adição da ligação –NO (m/z = 361) ou de três átomos de O (m/z = 374). Os PDs identificados neste trabalho (m/z = 161, 276 e 316) não foram identificados previamente na literatura. Ressalta-se que, em geral, os produtos de biotransformação da CIP são originados a partir da quebra ou alteração do anel piperazina, sendo também constatado a hidroxilação da molécula, clivagem do grupo ciclopropil e da ligação C–F em alguns casos.

Baseando-se nos espectros de MS/MS obtidos por meio dos experimentos realizados em batelada apresentados anteriormente, foi possível monitorar a presença dos subprodutos identificados nas amostras dos perfis espaciais dos reatores por meio das suas transições de massas do padrão de fragmentação (Figuras 72 e 74). Uma vez que não havia padrões analíticos dos PD identificados, não foi possível quantificá-los em termos de concentração no reator. Entretanto, baseando-se nos cromatogramas de íon extraído obtidos no modo SRM, foi possível inferir qualitativamente uma variação de concentração do PD ao longo do perfil espacial do reator (representado aqui pela relação L/D – comprimento / diâmetro), considerando a área relativa do pico cromatográfico, referente a área máxima obtida entre as amostras do perfil. Para efeito de apresentação dos resultados, foi escolhido o RALFE considerando as amostras do perfil do reator tratando esgoto lab-made durante a Fase VI e esgoto doméstico durante a Fase VII – Figuras 75 e 76. As concentrações relativas de SMX (Figura 75) e CIP (Figura 76) também foram apresentadas, em termos relativos à concentração inicial da alimentação. No Apêndice B são apresentados os cromatogramas obtidos para cada amostra do perfil do RALFE, em que se pode visualizar a variação de área dos picos cromatográficos.

Figura 75 - Produtos de degradação (PD) de SMX identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 256 (a e b), m/z 270 (c e d) e m/z 254 (e e f). C/C_0 corresponde a razão de concentração de SMX com relação a concentração inicial. $A/A_{máx}$ corresponde a razão de área dos cromatogramas dos PD apresentados na Figura B1 referente a área máxima obtida.

Fonte: Autoria própria.

Pôde-se constatar pelas Figuras 75 e 76 que a geração dos produtos de degradação ocorria concomitantemente à degradação dos antibióticos SMX e CIP, e na maioria dos casos não houve degradação significativa do metabólito gerado ao longo do perfil do RALFE, exceto para os PD de m/z 254 do SMX com esgoto lab-made, m/z 161 da CIP com esgoto doméstico, e m/z 276 da CIP com efluente lab-made, em que foi observada redução de 70 a 100 % na área do pico cromatográfico no efluente do reator. Os PDs foram identificados já no primeiro ponto de amostragem do reator, sendo que em alguns casos a área relativa aumentava e em outros diminuía, não sendo observado um padrão de geração dos metabólitos, mesmo comparando-se as amostras com esgoto lab-made e esgoto doméstico. Vale salientar que o TDH aplicado em

cada caso foi diferente (4 h com esgoto lab-made e 12 com esgoto doméstico), o que também pode ter influenciado nas diferenças de perfil entre as amostras nos dois casos.

Figura 76 - Produtos de degradação (PD) de CIP identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 161 (a e b), m/z 276 (c e d) e m/z 316 (e e f). C/C_0 corresponde a razão de concentração de CIP com relação a concentração inicial. $A/A_{máx}$ corresponde a razão de área dos cromatogramas dos PD apresentados na Figura B3 referente a área máxima obtida.

Fonte: Autoria própria.

Além das massas dos PDs obtidos no ensaio em batelada, foram monitoradas algumas transições de massas de PDs identificados em outros estudos de biodegradação de SMX e CIP apresentados na literatura. Dentre esses metabólitos que foram monitorados, foram identificados três PDs de SMX (m/z 239, 288 e 296) e seis de CIP (m/z 190, 223, 263, 306, 348 e 360) e suas estruturas moleculares propostas são apresentadas nas Tabelas 33 e 34. Nos Apêndices encontram-se também seus perfis de área relativa (Apêndice A) e os cromatogramas nos pontos de amostragem do RALFE (Apêndice B).

Tabela 33 - Estruturas moleculares propostas para os produtos de degradação de SMX, com sua transição de massa mais intensa, monitorados ao longo do perfil espacial do RALFE

PD [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>) Q1 (Q3)	Estrutura molecular proposta	Referência
256 (156)		Este trabalho
270 (156)		Este trabalho
254 (98)		Este trabalho
239 (77)		Kassotaki et al. (2016)
288 (228)		Jia et al. (2017)
296 (134)		Kassotaki et al. (2016)

Fonte: Autoria própria.

A Figura 77 mostra a distribuição relativa em termos de área cromatográfica dos diferentes PDs de SMX e CIP nas amostras do reator com esgoto lab-made e esgoto doméstico. Para o SMX, no esgoto lab-made, predominou o PD com *m/z* 254. Já no esgoto doméstico, os metabólitos predominantes foram os de *m/z* 288, 296 e 239, nessa ordem. Para a CIP, no esgoto lab-made, predominaram os compostos de *m/z* 360, 276 e 223, nessa ordem, enquanto no esgoto doméstico, os compostos predominantes foram os de *m/z* 263, 316 e 306, nessa ordem. Esses resultados evidenciam que as condições operacionais (como TDH) e as diferenças da matriz do substrato (esgoto lab-made e doméstico) e da composição microbiana no reator podem influenciar nas reações bioquímicas envolvidas na geração dos subprodutos de degradação.

Tabela 34 - Estruturas moleculares propostas para os produtos de degradação de CIP, com sua transição de massa mais intensa, monitoradas ao longo do perfil espacial do RALFE

PD [M+H] ⁺ (m/z) Q1 (Q3)	Estrutura molecular proposta	Referência
161 (144)		Este trabalho
276 (175)		Este trabalho
316 (102)		Este trabalho
190 (172)		Pan et al. (2018)
223 (207)		Pan et al. (2018)
263 (245)		Pan et al. (2018)
306 (288)		Pan et al. (2018)
348 (330)		Pan et al. (2018)
360 (342)		Pan et al. (2018)

Fonte: Autoria própria.

Figura 77 - Distribuição relativa em termos de área cromatográfica máxima para os produtos de degradação (PD) de SMX e CIP no RALFE operado com esgoto lab-made (Fase VI - TDH = 4 h) e esgoto doméstico (Fase VII - TDH = 12 h).

Fonte: Autoria própria.

5.10. Ensaios ecotoxicológicos

5.10.1. Determinação da LC50

Para a determinação da concentração letal mediana (LC50) foram selecionadas as seguintes concentrações-teste dos fármacos - 0, 1, 10, 20 e 50 mg L⁻¹, sendo as diluições preparadas em água ultrapura. O pH das amostras ficou entre 7,5 e 8 e a condutividade foi menor que 15 µS cm⁻¹. Na Figura 78 encontram-se os resultados de sobrevivência (em %) para os dois organismos-teste selecionados neste estudo sob as diferentes concentrações de SMX aplicadas. Constatou-se que a LC50 foi maior que 50 mgSMX L⁻¹ para *Chironomus sancticaroli* e está entre 20 e 50 mgSMX L⁻¹ para *Allonais inaequalis*. Pode-se inferir, portanto, que a espécie de oligoqueta *Allonais inaequalis* se mostrou mais sensível do que a espécie de

chironomídeo. A maior sensibilidade de *Allonais inaequalis* comparado a *Chironomus sancticaroli* foi apresentada anteriormente nos estudos de Higashi (2016) e Araújo (2018), que empregaram KCl e $K_2Cr_2O_7$ como compostos de interesse, respectivamente.

Para a ciprofloxacina não foi possível estimar a LC50 pois as soluções teste preparadas ficaram com pH muito abaixo (por volta de 3) do recomendado devido a erros de diluição do padrão na amostra, o que ocasionou a morte dos organismos durante o ensaio. Devido a falta de organismos-teste e tempo hábil para o encerramento do projeto, a LC50 da CIP não foi determinada neste trabalho.

Figura 78 - Ensaio agudo para determinação da LC50 de SMX sobre os organismos *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis*

Fonte: Autoria própria.

5.10.2. Ensaio Agudos

O ensaio agudo com *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis* foi realizado com amostras afluente (A) e efluente (E) do reator e os resultados de sobrevivência (%) se encontram na Figura 79. As amostras testadas nesse ensaio foram as seguintes: C – controle (água destilada e solução de alimento); EL0 – efluente do RALFE alimentado com esgoto lab-made sem antibiótico durante a Fase I; ELF – efluente do RALFE fortificado com 3 mg L⁻¹ de SMX e CIP; AL0 – esgoto lab-made ao reator sem antibiótico (meio Torres (1992)); ALF – esgoto lab-made fortificado com 3 mg L⁻¹ de SMX e CIP; AD – esgoto doméstico (afluente ao reator) usado na Fase VII (540 ng L⁻¹ de SMX e 730 ng L⁻¹ de CIP); ED – efluente do RALFE alimentado com esgoto doméstico durante a Fase VII (60 ng L⁻¹ de SMX e 140 ng L⁻¹ de CIP).

O pH do ensaio se manteve na faixa de 7 a 8 e a condutividade das amostras afluente e efluente dos reatores foi de $850 \pm 68 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Para os organismos *Chironomus sancticaroli*, pode-se observar pela Figura 79 que eles apresentaram o mesmo comportamento na amostra controle e na amostra efluente do reator sem antibiótico. Assim, para os ensaios posteriores, utilizou-se como branco do ensaio somente amostra efluente sem a presença dos antibióticos.

Figura 79 - Ensaio do potencial ecotoxicológico agudo (96 h) das amostras afluente e efluente do RALFE sobre os organismos *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis*

Fonte: Autoria própria.

Comparando-se as amostras de esgoto lab-made em baixa concentração e em alta concentração (3 mg L^{-1}), bem como para o efluente de esgoto doméstico, não foi observado mortalidade nas condições do ensaio (100 % de sobrevivência). No entanto, para as amostras afluente ao reator, seja esgoto lab-made ou doméstico, observou-se 100 % de mortalidade para todas as amostras, uma vez que houve a fermentação do meio, possivelmente levando a depleção de oxigênio dissolvido e impedindo o desenvolvimento dos organismos. Pode-se inferir, portanto, que as configurações de reatores propostas neste estudo – RALFE e RALFO – foram eficazes na eliminação do potencial ecotoxicológico sobre a espécie *Chironomus sancticaroli*, sendo que o efluente produzido nestes reatores não causaria nenhum efeito ecotoxicológico agudo sobre essa espécie, mesmo em concentrações elevadas dos fármacos SMX e CIP (3 mg L^{-1}). Em contrapartida, constatou-se que a espécie *Allonais inaequalis* foi

extremamente sensível ao efluente produzido nos reatores, sendo observado 100 % de mortalidade para todas as amostras analisadas. A queda de oxigênio dissolvido no substrato e ausência de sedimento nos frascos-teste podem ter contribuído para a mortalidade dos organismos.

5.10.3. Ensaios Crônicos

Para o ensaio crônico não foi utilizado o organismo *Allonais inaequalis*, uma vez que ele mostrou 100 % de mortalidade para todas as amostras do ensaio agudo. Assim, para o teste crônico com *Chironomus sancticaroli* foram utilizadas as larvas após eclodirem da desova (por volta de 26 h – Figura 80. As amostras utilizadas nesse ensaio foram as seguintes: C – controle (sem antibiótico); EL – efluente do RALFE tratando esgoto lab-made na concentração de 120 ng L⁻¹ de SMX e 160 ng L⁻¹ de CIP; ED – efluente do RALFE tratando esgoto doméstico na concentração efluente de 190 ng L⁻¹ de SMX e 100 ng L⁻¹ de CIP; ELF-SMX – efluente do RALFE tratando esgoto lab-made (sem antibiótico) fortificado com 40 µg L⁻¹ de SMX; ELF-CIP – efluente do RALFE tratando esgoto lab-made (sem antibiótico) fortificado com 40 µg L⁻¹ de CIP. O pH do ensaio se manteve entre 7 e 8 a condutividade das amostras de esgoto lab-made foi de 1125 ± 46 µS cm⁻¹, e das amostras de efluente de esgoto doméstico foi de 451 ± 1 µS cm⁻¹.

Figura 80 - Massa ovígera de *Chironomus sancticaroli*, observada com estereomicroscópio, utilizada no ensaio crônico – recém-formada (a); após 24 h (b); em processo de eclosão das larvas, aproximadamente 26 h (c)

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 81 encontram-se os resultados referentes a porcentagem de sobrevivência das larvas ao final de 10 dias de ensaio crônico (Figura 82). Um frasco teste para cada amostra foi deixado sob análise por mais 7 dias para a verificação da porcentagem de emergência de adultos em cada amostra (Figura 81).

Comparando-se os resultados de sobrevivência das amostras com e sem antibióticos (controle), observa-se uma maior mortalidade nas amostras com os fármacos, o que poderia ser devido a uma inibição direta do antimicrobiano sobre o desenvolvimento larval, ou uma inibição sobre o crescimento de bactérias ou algas presentes no substrato que são importantes na nutrição dos chironomídeos.

Figura 81 - Avaliação da sobrevivência e emergência de adultos durante o ensaio crônico das amostras efluente do RALFE sobre *Chironomus sancticaroli*

Fonte: Autoria própria.

Figura 82 - Larvas de *Chironomus sancticaroli* observadas com estereomicroscópio após 10 dias de ensaio crônico – diferenças entre organismos vivos (a) e não-vivos (b)

Fonte: Autoria própria.

Constatou-se maior sobrevivência das larvas de *Chironomus sancticaroli* no efluente de esgoto doméstico do que no esgoto lab-made, independente das maiores concentrações aplicadas dos fármacos. Isso pode ser devido ao maior conteúdo de matéria orgânica e nutrientes (nitrogênio e fósforo) presente no efluente de esgoto, que podem ter favorecido o desenvolvimento desses organismos. Ademais, observou-se nessas amostras uma maior presença de algas esverdeadas, que também podem ter contribuído na nutrição dos chironomídeos.

Na Figura 83 são mostradas algumas imagens obtidas ao final de 17 dias do ensaio crônico. Para alguns frascos, houve total emergência de adultos, com detalhes na Figura 83 (83a, 83b, 83c, 83d e 83g). Em algumas amostras as larvas não chegaram a emergir adulto, ficando no estágio de pupa (Figura 83e), o que denota um atraso no desenvolvimento. Nos frascos com emergência de adulto foi possível constatar a presença dos exoesqueletos (Figura 83f). Além disso, para as amostras ER e ES-CIP ainda foi possível observar a presença de desovas em estágio inicial de formação (Figura 83h).

Comparando-se as amostras, pôde-se observar uma redução significativa de emergência de adultos no esgoto lab-made do RALFE fortificado com $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de SMX. Esse resultado indica uma possível inibição direta do fármaco sobre o desenvolvimento larval ou sobre o crescimento de bactérias ou algas responsáveis pela nutrição dos chironomídeos. Isso não ocorreu para a ciprofloxacina, o que denota maior resistência a esse fármaco.

Pode-se inferir pelos resultados apresentados que o efluente dos reatores não tem potencial ecotoxicológico crônico significativo sobre o desenvolvimento de *Chironomus sancticaroli*, considerando somente a porcentagem de mortalidade dos organismos. Tem-se ainda que os efluentes, ao serem despejados nos corpos receptores teriam uma redução do seu impacto ecotoxicológico na zona de mistura, e ao longo das águas superficiais, por meio da autodepuração. Entretanto, observou-se um possível efeito do antibiótico SMX sobre o desenvolvimento larval e emergência de adultos de *Chironomus sancticaroli*. Ressalta-se que estudos posteriores devem ser conduzidos a fim de avaliar possíveis alterações genéticas nos organismos, por meio de medidas do comprimento larval, do comprimento da asa e da taxa de fecundidade, por exemplo (STRIXINO; STRIXINO, 1985).

Figura 83 - Imagens do ensaio crônico com *Chironomus sancticaroli* ao final de 17 dias – organismos adultos (a – fêmea, b – macho), detalhe das asas dos insetos adultos (c e d), estágio de pupa (e), exoesqueleto da pupa que emergiu adulto (f), adulto na parede do frasco (g), e desova resultante ao final do ensaio (h)

Fonte: Autoria própria.

5.11. Ensaios de atividade antimicrobiana

Na Figura 84 foram apresentados os resultados de densidade óptica (absorbância a 600 nm) de *Escherichia coli* em tubos de ensaio com caldo LB para diferentes concentrações de SMX e CIP. Observou-se que o SMX não causou nenhuma inibição sobre a cepa de *E. coli*, enquanto para a CIP a partir da concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ houve uma inibição significativa sobre o crescimento dos microorganismos. Como era de se esperar, a ampicilina usada como controle negativo resultou em 100 % de inibição sobre *E. coli*.

Figura 84 - Teste de macrodiluição em tubos da atividade antimicrobiana de SMX e CIP sobre *E. coli* durante 24 h de ensaio

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 85 encontram-se os resultados referentes ao ensaio de atividade antimicrobiana de SMX e CIP em esgoto lab-made (TORRES, 1992) sobre os microrganismos *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* e *Escherichia coli* e na Figura 86 são mostrados os tubos após 190 horas de incubação para as concentrações estudadas. Tem-se que quanto mais turvo o substrato maior o crescimento dos microrganismos.

Corroborando com o ensaio anterior, para SMX não foi constatado inibição significativa sobre os microrganismos-teste nas concentrações estudadas, o que denota a degradação do fármaco por cometabolismo ao substrato principal, como já mencionado anteriormente, sendo o fármaco utilizado como fonte suplementar de carbono, nitrogênio e enxofre pelas bactérias. Para a concentração de 400 ngSMX L^{-1} sobre a cultura de *Ochrobactrum sp.* possivelmente

ocorreu alguma contaminação do tubo de ensaio, pois não houve crescimento, o que não era esperado, pois, para as maiores concentrações, a cultura cresceu de forma similar ao controle.

Ao contrário da sulfonamida, para a ciprofloxacina houve inibição significativa para *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.* e *Sphingomonas sp.* a partir de 5 mg L⁻¹, e para *E. coli* a partir de 200 µg L⁻¹, sendo essa mais sensível ao fármaco, o que também é condizente com o ensaio em substrato LB (Figura 84).

Figura 85 - Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana de SMX e CIP em esgoto lab-made sobre *Ochrobactrum sp.* (a), *Brevundimonas sp.* (b), *Sphingomonas sp.* (c) e *Escherichia coli* (d)

Fonte: Autoria própria.

Figura 86 - Tubos após 190 h de incubação. M = esgoto lab-made (amostra zero); B = Amostra em Branco somente com o substrato e a cultura mãe, sem antibiótico; C1 = 400 ng L⁻¹; C2 = 200 µg L⁻¹; C3 = 5 mg L⁻¹; e C4 = 10 mg L⁻¹

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 87 são destacados os halos de inibição em placas de petri resultantes da exposição das culturas de *E. Coli* e *Ochrobactrum sp.* para a concentração teste de 5 mgCIP L⁻¹ adicionada ao esgoto lab-made do RALFE. Para as amostras com concentrações reais no efluente (100 a 200 ng L⁻¹ SMX / CIP), bem como para a concentração superestimada de 5 mgSMX L⁻¹, não foi identificada a presença de halos de inibição. Da mesma forma, para os microrganismos-teste *Brevundimonas sp.* e *Sphingomonas sp.* não foi detectada inibição para todas as condições testadas.

Figura 87 - Presença de halos de inibição no ensaio de atividade antimicrobiana em placas para os gêneros *E. Coli* e *Ochrobactrum sp.* para a concentração de 5 mgCIP L⁻¹ presente no efluente do reator anaeróbio

Fonte: Autoria própria.

5.12. Avaliação da influência da etapa hidrolítica / acidogênica sobre a remoção de MPOs

Nas seções seguintes são apresentados os resultados referentes à operação do reator CSTR para avaliação da influência das etapas de hidrólise e acidogênese sobre a remoção de vários micropoluentes orgânicos.

5.12.1. Performance do reator hidrolítico / acidogênico

O reator apresentou boa performance de acidificação (> 50 %) tanto durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese), quanto na fermentação da glicose (acidogênese), como pode ser visualizado na Figura 88. Na Figura 89 pode-se visualizar a composição de AGV efluente ao longo do tempo em termos de DQO equivalente. Com a mudança do substrato principal de amido para glicose houve um maior desempenho na acidificação do reator (de 52 para 69 % em média), devido principalmente ao maior conteúdo de ácido butírico. Uma vez que o amido deve ser hidrolisado a glicose para ser metabolizado pelos microrganismos, a concentração de glicose biodisponível na segunda fase foi maior, o que pode ter levado às diferenças encontradas nas rotas metabólicas e maior eficiência de acidificação (TEMUDO; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007; ROMBOUTS et al., 2019). Tem-se como hipótese também que o amido não foi completamente hidrolisado no reator, gerando polissacarídeos intermediários ou oligossacarídeos e/ou tendo uma fração precipitada, uma vez que sua dissolução não foi completa, e, portanto, resultando em menor acidificação na primeira fase operacional. As amostragens para análise de MPOs foram realizadas em condições estáveis de operação e bom desempenho de acidificação do reator (barras azuis na Figura 88).

Figura 88 - Performance de acidificação do reator durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). As colunas azuis correspondem aos períodos em que foram feitas as amostragens para análise dos MPOs. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Figura 89 - Perfil temporal de AGV gerados no efluente (em termos de DQO equivalente) durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

O balanço de massa em termos de DQO foi feito e está apresentado na Figura 90. Constatou-se que a maior parte do substrato é convertida a AGV, enquanto uma pequena fração (10 a 20 %) da DQO efluente corresponde a outros produtos solúveis da fermentação (PSF), sendo que foi possível detectar durante a fermentação da glicose a presença de ácido fórmico (0,3 %) e etanol (4 %). Todo substrato foi consumido no reator, uma vez que não foi detectado sua presença no efluente, e aproximadamente 6,5 % foi utilizado para o crescimento celular, por anabolismo.

Uma vez que não foi detectado CH₄ no biogás, toda a remoção de DQO do sistema foi devida a presença biohidrogênio (H_{2(g)}). Assim, foi possível estimar o rendimento de H₂ em cada fase operacional – 2,7 mol H_{2(g)} mol⁻¹amido (Fase I) e 1,7 mol H_{2(g)} mol⁻¹glicose (Fase II). Comparando-se com os resultados da literatura, para o amido a faixa de rendimento encontrada está entre 0,6 e 3,2 mol H_{2(g)} mol⁻¹amido (LOGAN et al., 2002; HUSSY et al., 2003; SU et al., 2009), enquanto para a glicose o resultado obtido neste estudo foi próximo aos apresentados na literatura - 1,7 mol H_{2(g)} mol⁻¹glicose (LIN; CHANG, 1999); 2,1 mol H_{2(g)} mol⁻¹glicose (FANG; LIU, 2002); e 2,3 mol H_{2(g)} mol⁻¹glicose (REGUEIRA et al., 2018).

Figura 90 - Balanço de massa de DQO e composição média de AGV (em termos de DQO equivalente) no reator acidogênico durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 35 são apresentados os valores médios dos parâmetros operacionais e resultados de performance do reator em cada fase.

Tabela 35 - Compilação dos resultados e parâmetros de desempenho operacional do reator hidrolítico / acidogênico para ambas as fases de operação. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Parâmetro (Unidade)	Hidrólise + Acidogênese (Média ± Desvio Padrão)	Acidogênese (Média ± Desvio Padrão)
Substrato	Amido	Glicose
Período de operação (d)	0-132	132-258
Temperatura (°C)	37	37
pH	5,0 ± 0,2	5,0 ± 0,2
COV (gCOD L ⁻¹ d ⁻¹)	3,1	3,1
TDH (d)	4	4
TRC (d)	36 ± 8	26 ± 6
DQO Afl. (g L ⁻¹)	12,4 ± 0,3	12,5 ± 0,7
DQO Efl. (g L ⁻¹)	8,18 ± 0,68	9,85 ± 0,71
Remoção DQO (%)	34,1 ± 5,5	19,2 ± 4,1
Acético (gDQO L ⁻¹)	2,43 ± 0,42	2,24 ± 0,51
Propiônico (gDQO L ⁻¹)	0,64 ± 0,36	0,48 ± 0,27
Butírico (gDQO L ⁻¹)	2,59 ± 0,77	4,61 ± 0,81
AGV Total (gDQO L ⁻¹)	6,42 ± 1,02	8,58 ± 0,97
Acidificação (%)	52 ± 8	69 ± 8
Outros PSF (gDQO L ⁻¹)	1,90 ± 0,69	1,31 ± 0,93
H ₂ (gDQO d ⁻¹)	4,08	2,28
Y _{H2} (molH ₂ mol ⁻¹ substrato)	2,73	1,74
Y _{biomassa} (gDQO g ⁻¹ SSV)	1,45	1,40
SST Reator (g L ⁻¹)	5,70 ± 0,85	3,59 ± 1,14
SST Efluente (g L ⁻¹)	0,64 ± 0,09	0,59 ± 0,25
SSV Reator (g L ⁻¹)	5,32 ± 0,80	3,38 ± 1,10
SSV Efluente (g L ⁻¹)	0,59 ± 0,07	0,56 ± 0,23

Fonte: Autoria própria.

5.12.2. Biotransformação, sorção e remoção abiótica dos MPOs

Para avaliação da sorção dos MPOs foram calculados os valores de $\log K_D$, sendo representados graficamente na Figura 91. De acordo com o grau de sorção na biomassa, os compostos foram divididos em três grupos, de acordo com Gonzalez-Gil et al. (2018): alta sorção ($\log K_D \geq 2,5$), sorção moderada ($2,0 < \log K_D \leq 2,5$); e baixa sorção ($\log K_D \leq 2,0$). Os resultados encontrados para o $\log K_D$ desses compostos estão em concordância com as faixas de valores encontradas na literatura para sistemas anaeróbios (Tabela 36).

Figura 91 - Coeficiente de partição ($\log K_D$) na biomassa hidrolítica / acidogênica e eliminação de MPOs por sorção (%). Valores da literatura apresentados na Tabela 36. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Tabela 36 - Valores de $\log K_D$ indicados na literatura em condições anaeróbias.

OMP	Gonzalez-Gil et al. (2016)	Carballa et al. (2007)	Narumiya et al. (2013)	Clara et al. (2011)	Alvarino et al. (2014) (2016b)	Yang et al. (2016)	Xue et al. (2010)	Ifelebuegu (2011)	Johnson et al. (2000)
OP	-	-	-	-	-	-	3,87	-	4,68 - 5,35
TCS	3,56 - 4,35	-	-	-	-	2,26	-	-	-
NP	-	-	-	-	-	-	4,63	-	-
AHTN	4,22 - 4,86	3,70 - 4,43	-	3,73 - 4,30	3,00 - 3,60	-	4,06	-	-
HHCB	2,58 - 5,14	3,45 - 4,30	-	3,87 - 4,34	3,18 - 3,65	-	3,76	-	-
ADBI	-	-	-	-	3,00 - 3,30	-	-	-	-
FLX	2,44 - 3,44	-	-	-	2,60 - 2,85	2,50	-	-	-
EE2	1,21 - 1,40	2,08 - 2,85	-	-	2,48 - 2,54	-	-	2,69 - 2,76	-
E2	2,22 - 3,34	2,30 - 2,83	-	-	2,30 - 2,60	-	-	2,37 - 2,41	-
E1	1,76 - 2,91	2,18 - 2,77	-	-	2,40 - 2,54	-	-	2,59 - 2,67	-
DCF	-	1,26 - 2,18	1,90 - 2,20	-	1,00	1,66	2,49	-	-
ERY	-	-	1,60 - 3,10	-	1,00 - 1,48	-	-	-	-
ROX	2,52 - 3,97	1,14 - 1,92	1,90 - 3,30	-	0,70 - 1,85	-	-	-	-
BPA	-	-	-	-	-	1,98	-	-	-
DZP	1,85 - 1,88	-	-	-	1,30 - 2,60	-	-	-	-
NPX	-	-	-	-	2,08	0,91	-	-	-
TMP	1,92 - 2,86	1,00 - 1,78	-	-	0,70 - 1,30	1,95	-	-	-
SMX	-	0,77 - 1,79	-	-	0,00 - 2,18	-	-	-	-
CTL	1,80 - 2,80	-	-	-	-	-	-	-	-
IBP	1,03 - 1,76	1,00 - 1,78	-	-	1,60 - 2,00	1,76	-	-	-
CBZ	1,60 - 2,27	1,31 - 1,83	1,60 - 2,00	-	1,3	1,47	3,58	-	-

Fonte: Autoria própria.

Constatou-se que a sorção foi fortemente influenciada pela hidrofilicidade / hidrofobicidade dos compostos, o que vai de acordo com os resultados de Tadkaew et al., (2011), Wijekoon et al. (2015) e Yang et al. (2016). Entretanto, interações eletrostáticas dos compostos com o lodo também podem ter influenciado na sorção (MALMBORG; MAGNÉR, 2015; PHAN et al., 2018; TRAN; REINHARD; GIN, 2018).

Na Figura 92 estão representados comparativamente os resultados de biotransformação obtidos durante a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (somente acidogênese). De acordo com os resultados apresentados não houve diferença significativa entre os valores de ambas as fases, o que foi confirmado por teste estatístico (ANOVA $\alpha = 0,05$). Dessa forma, constatou-se que a etapa hidrolítica não contribuiu significativamente para a biotransformação dos compostos, sendo a acidogênese uma etapa fundamental para a eliminação dos MPOs estudados. Os resultados estão detalhados na Tabela 37, sendo também apresentada a contribuição da sorção sobre a eliminação total de MPOs.

Figura 92 - Correlação entre os valores de biotransformação durante a a fermentação do amido (hidrólise + acidogênese) e da glicose (acidogênese). Os valores detalhados são apresentados na Tabela 37. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Tabela 37 - Resultados de biotransformação e sorção (média $\pm$ desvio padrão) de MPOs durante cada etapa (fermentação do amido e da glicose) e durante toda a operação. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

MPO	Hidrólise + Acidogênese (n=6)		Acidogênese (n=9)		Toda operação (n=15)	
	BT (%)	Sorção (%)	BT (%)	Sorção (%)	BT (%)	Sorção (%)
SMX	99 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	96 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	97 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0
HHCB	69 $\pm$ 9	24 $\pm$ 8	69 $\pm$ 9	20 $\pm$ 9	69 $\pm$ 9	22 $\pm$ 9
ADBI	66 $\pm$ 12	26 $\pm$ 11	69 $\pm$ 9	19 $\pm$ 7	68 $\pm$ 10	21 $\pm$ 10
TMP	65 $\pm$ 1	1 $\pm$ 2	68 $\pm$ 9	1 $\pm$ 1	67 $\pm$ 9	1 $\pm$ 1
AHTN	62 $\pm$ 9	31 $\pm$ 8	67 $\pm$ 10	25 $\pm$ 10	65 $\pm$ 10	27 $\pm$ 10
OP	60 $\pm$ 15	37 $\pm$ 16	53 $\pm$ 16	39 $\pm$ 17	56 $\pm$ 16	38 $\pm$ 16
ERY	54 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	56 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	55 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1
ROX	57 $\pm$ 9	3 $\pm$ 2	51 $\pm$ 10	3 $\pm$ 2	53 $\pm$ 10	3 $\pm$ 2
NP	50 $\pm$ 17	46 $\pm$ 16	51 $\pm$ 10	41 $\pm$ 11	51 $\pm$ 14	43 $\pm$ 13
NPX	36 $\pm$ 13	2 $\pm$ 1	33 $\pm$ 17	3 $\pm$ 1	34 $\pm$ 16	2 $\pm$ 1
DCF	30 $\pm$ 8	5 $\pm$ 5	27 $\pm$ 6	8 $\pm$ 1	28 $\pm$ 7	7 $\pm$ 4
DZP	33 $\pm$ 13	5 $\pm$ 2	22 $\pm$ 7	3 $\pm$ 1	26 $\pm$ 11	4 $\pm$ 2
TCS	27 $\pm$ 13	71 $\pm$ 14	20 $\pm$ 9	64 $\pm$ 14	22 $\pm$ 12	67 $\pm$ 14
FLX	29 $\pm$ 10	19 $\pm$ 6	36 $\pm$ 7	12 $\pm$ 2	33 $\pm$ 9	15 $\pm$ 5
EE2	26 $\pm$ 9	16 $\pm$ 4	29 $\pm$ 13	9 $\pm$ 2	28 $\pm$ 12	11 $\pm$ 4
IBP	25 $\pm$ 8	4 $\pm$ 1	22 $\pm$ 12	2 $\pm$ 1	23 $\pm$ 11	3 $\pm$ 1
E1 + E2	24 $\pm$ 11	11 $\pm$ 2	28 $\pm$ 15	5 $\pm$ 1	26 $\pm$ 14	8 $\pm$ 3
CTL	23 $\pm$ 7	1 $\pm$ 1	18 $\pm$ 8	2 $\pm$ 0	19 $\pm$ 9	2 $\pm$ 1
BPA	22 $\pm$ 12	5 $\pm$ 3	20 $\pm$ 6	4 $\pm$ 1	21 $\pm$ 9	5 $\pm$ 2
CBZ	11 $\pm$ 7	4 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	1 $\pm$ 0	13 $\pm$ 5	2 $\pm$ 2

Fonte: Autoria própria.

As constantes de biotransformação (k_{bio}) também foram calculadas, sendo os resultados comparados aos obtidos por Alvarino et al. (2014) em reator UASB na Tabela 38. Assim, para efeito de discussão, os compostos foram divididos em três grupos: compostos altamente biotransformados ($BT > 80\%$ e $k_{bio} \geq 0,1 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) – SMX; compostos com biotransformação moderada (BT entre 50 e 80 % e $0,04 < k_{bio} < 0,1 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) – HHCB, AHTN, ADBI, OP, NP, TMP, ROX e ERY; e MPOs com baixa biotransformação ($< 50\%$ e $k_{bio} \leq 0,04 \text{ L g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) – IBP, DCF, NPX, FLX, CBZ, CTL, DZP, BPA, TCS, E1 + E2, EE2.

Tabela 38 - Valores de k_{bio} ($L\ g^{-1}SSV\ d^{-1}$) calculados para cada MPO e comparação com os resultados prévios obtidos em reator UASB. Valores destacados em verde, amarelo e vermelho indicam alta ($k_{bio} \geq 0,1$), média ($0,04 < k_{bio} < 0,1$) e baixa BT ($k_{bio} \leq 0,04$), respectivamente. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

MPO	Este trabalho	Alvarino et al. (2014)
SMX	0,268 ± 0,071	0,360 ± 0,110
TMP	0,087 ± 0,029	1,800 ± 0,200
ADBI	0,084 ± 0,033	0,050 ± 0,001
HHCB	0,083 ± 0,032	0,010 ± 0,005
AHTN	0,076 ± 0,033	0,040 ± 0,002
OP	0,059 ± 0,027	
NP	0,051 ± 0,023	
ROX	0,050 ± 0,022	0,006 ± 0,003
ERY	0,054 ± 0,015	0,001 ± 0,005
NPX	0,034 ± 0,023	1,110 ± 1,200
FLX	0,029 ± 0,014	0,003 ± 0,006
DCF	0,028 ± 0,019	0,007 ± 0,003
TCS	0,027 ± 0,022	
EE2	0,024 ± 0,015	0,040 ± 0,002
E1 + E2	0,022 ± 0,017	
DZP	0,020 ± 0,008	0,004 ± 0,002
IBP	0,018 ± 0,014	0,007 ± 0,003
BPA	0,016 ± 0,008	
CTL	0,016 ± 0,008	
CBZ	0,010 ± 0,005	0,003 ± 0,005

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 93 podem ser visualizados os resultados médios de biotransformação dos MPOs comparados às faixas de remoção observadas na literatura (detalhes nas Tabelas 4 e 5). Esta comparação é qualitativa, uma vez que na grande parte dos estudos apresentados na literatura, não há distinção entre o que é removido e o que é de fato biotransformado. Ademais, para alguns compostos a faixa de variação de remoção é bastante grande e / ou são encontrados poucos valores ($n \leq 5$ para ADBI, OP, ERY e CTL).

Figura 93 - Comparação entre a biotransformação para a fase hidrolítica / acidogênica com a faixa de valores de remoção de MPOs em sistemas anaeróbios apresentada na literatura (detalhes nas Tabelas 4 e 5). n corresponde ao número de valores encontrados para cada MPO. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

A fim de compreender os mecanismos envolvidos na biotransformação dos compostos, foi levado em conta as diferentes estruturas moleculares dos MPOs em estudo (Tabela 12), que podem exercer uma grande influência sobre a eliminação dos compostos (TADKAEW et al., 2011; SEMBLANTE et al., 2015; WIJEKOON et al., 2015; YANG et al., 2017; PHAN et al., 2018; TRAN; REINHARD; GIN, 2018). De acordo com Wijekoon et al. (2015), compostos contendo apenas grupos doadores de elétrons (electron donating groups – EDGs), tais como –NH₂; –NHR; –NR₂; –OH; –CH₃; –OCH₃; R – CO – R) poderiam ser mais susceptíveis a biotransformação. Em contrapartida, tem-se que aqueles contendo grupos receptores de elétrons (electron withdrawing groups – EWGs), tais como –C≡N; –CF₃; –COOH; –COOR; –COR; –Cl; –F; –CONH₂; –CHO), poderiam ser mais recalcitrantes. Por exemplo, a baixa biotransformação da CBZ observada no reator hidrolítico / acidogênico está em concordância com os dados da literatura (Figura 93), evidenciando que a presença do EWG (–CONH₂) na sua estrutura molecular poderia explicar o comportamento recalcitrante do composto. Da mesma forma, a presença dos EWGs nos compostos IBP (–COOH), DCF (–COOH; –Cl), CTL (–F, –C≡N), DZP (–Cl), TCS (–Cl) e FLX (–CF₃, –COR) poderia ser um fator chave na baixa biotransformação desses MPOs. Em contrapartida, a alta biotransformação do SMX (EDGs: –NH₂, –CH₃, –NHR) e TMP (EDGs: –OCH₃, –NH₂, –NHR), por exemplo, poderia ser atribuída a presença de EDGs na sua estrutura molecular.

Embora a presença de EDGs e EWGs mostrou ser um fator importante na biotransformação de MPOs, esta também pode ter sido influenciada por outros fatores relacionados a biodisponibilidade e características físico-químicas dos compostos, tais como hidrofobicidade, coeficiente de partição e massa molar (MONSALVO et al., 2014; WIJEKOON et al., 2015; AEMIG et al., 2016). Por exemplo, compostos com alta capacidade de sorção ($\log K_D > 2.5$) e com EDGs em sua estrutura molecular - AHTN, HHCB, ADBI, OP e NP apresentaram moderada eficiência de biotransformação (50 - 80 %), sugerindo que esta pode ocorrer após atingir equilíbrio sortivo na biomassa. De fato, compostos com EDGs, porém com menor capacidade de sorção ($\log K_D < 2.5$ - E1/E2, EE2 e BPA), apresentaram baixa biotransformação (Figura 93). Já o TCS, que apresentou alta capacidade de sorção não apresentou alta eliminação por biotransformação, o que pode ser devido a presença de EWG na sua estrutura molecular.

Comparando-se os resultados de k_{bio} obtidos neste estudo com aqueles obtidos para UASB (ALVARINO et al., 2014) (Tabela 38), observa-se que a maioria dos MPOs apresenta valores similares em ambos sistemas. Porém, alguns MPOs como TMP e NPX são melhor biotransformados na digestão anaeróbia global, enquanto que outros compostos como HHCB, AHTN, ROX e ERY apresentaram biotransformação favorecida em condições acidogênicas. Pode-se inferir da Figura 93 que a biotransformação anaeróbia da maioria dos compostos ocorre cometabolicamente durante a hidrólise / acidogênese de carboidratos, sendo que para alguns compostos, como NPX, TMP e CTL, esta etapa representa um papel de menor relevância na remoção anaeróbia.

Com relação a eliminação abiótica dos compostos, foi observado que somente para a ERY, esse mecanismo é relevante na sua remoção total do sistema. Pela Figura 94 pode ser observado que a ERY foi completamente removida nos ensaios abiótico e biótico a pH 5. No entanto, a biotransformação poderia ocorrer concomitantemente à eliminação abiótica do composto. Levando em conta que a biomassa apresentou a mesma capacidade de biotransformação a pH 5 e 7, foi estabelecido que aproximadamente 55 % da ERY foi biotransformada e 40 % foi removida abioticamente do reator. Este comportamento concorda com os resultados de Atkins, Herbert e Jones (1986) e Göbel et al. (2004), que observaram a instabilidade da ERY sob condições ácidas e a formação do composto inativo ERY-H₂O nessas condições. Com relação a ROX, embora uma pequena diminuição (15 a 20 %) na sua concentração foi observada nos ensaios abiótico e biótico a pH 5, isso não foi significativo. Apesar de ROX e ERY apresentarem estruturas moleculares similares, a ROX possui uma maior estabilidade sob condições ácidas, uma vez que este macrolídeo foi especificamente

sintetizado a partir da ERY, a fim de evitar sua decomposição no suco gástrico (GASC; D'AMBRIERES; LUTZ, 1990; MAZZEI et al., 1993). Conforme era esperado, a CBZ (controle negativo) provou ser altamente persistente nos ensaios abiótico e biótico, não sendo influenciada pelo pH.

Figura 94 - Efeito do pH sobre a eliminação dos antibióticos macrolídeos ERY e ROX nos ensaios biótico e abiótico. CBZ foi utilizada como controle negativo. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 95 estão apresentados os resultados compilados de biotransformação, sorção e remoção abiótica para os MPOs analisados neste estudo.

Figura 95 - Distribuição em massa da eliminação de MPOs durante a fase hidrolítica / acidogênica em termos de biotransformação, sorção, remoção abiótica e fração remanescente no efluente. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

5.12.3. Influência da atividade enzimática sobre a biotransformação dos MPOs

Para a estimativa do conteúdo enzimático no reator foi analisado a concentração de proteínas na amostra do lisado celular sem tratamento; no lisado celular que passou pela coluna PD10, considerando a primeira e segunda eluição; e no lisado que foi concentrado (> 3kDa) e rejeitado (< 3 kDa) na membrana de ultrafiltração. A Figura 96 mostra a placa de 96 poços com as amostras de sobrenadante e lisado analisadas. A Tabela 39 indica os resultados obtidos da concentração de proteínas e atividade enzimática para as enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação do amido alfa-amilase e glucoamilase.

Observou-se que os métodos adotados para análise da atividade enzimática no reator foram aplicáveis, porém constatou-se que para a obtenção do lisado e sobrenadante sem qualquer tipo de tratamento a recuperação foi maior. Os resultados apresentados correspondem aproximadamente à atividade teórica estimada de 12 U L^{-1} ($\mu\text{mol amido L}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Com relação a enzima hexoquinase, envolvida na degradação da glicose na acidogênese, obteve-se na Figura 97 o gráfico resultante da produção de NADH do lisado celular para determinação da atividade enzimática. O resultado obtido foi de $1,6 \text{ U L}^{-1}$.

Os resultados mostraram que foi possível medir a atividade enzimática no reator referente a enzimas chave na fermentação do amido e da glicose, e que poderiam atuar na biotransformação cometabólica dos MPOs.

Figura 96 - Quantificação em microplaca de 96 poços do teor de proteínas das amostras sobrenadante e lisado celular usadas na determinação da atividade enzimática do reator.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 39 - Valores de atividade enzimática presente no reator hidrolítico / acidogênico referente às enzimas alfa-amilase e glucoamilase. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Amostra	Glucoamilase (g glicose L ⁻¹ d ⁻¹)	Glucoamilase (U L ⁻¹)	Alfa-amilase (U L ⁻¹)	Proteína (mg L ⁻¹)
Sobrenadante sem tratamento	0,2	0,8	4,0	119
Lisado celular sem tratamento	1,3	4,9	7,0	172
Sobrenadante PD10	0,1	0,3	1,7	15
Lisado Celular PD10	1,2	4,8	3,6	113
Sobrenadante UF	0,7	2,5	1,0	18
Lisado celular UF	1,1	4,2	3,0	145

Fonte: Autoria própria.

Figura 97 - Curva analítica obtida para determinação da atividade enzimática da hexoquinase no lisado celular. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Para a hexoquinase (HK) foi possível realizar um ensaio *in vitro* com a enzima comercial Hexoquinase H4502 (Sigma-Aldrich), proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* e os resultados encontram-se na Figura 98. Na Figura 99 é mostrado o gráfico de degradação da glicose durante o ensaio (24 h), sendo que a atividade enzimática da HK foi mantida em 18 ± 6 U L⁻¹. Por meio do ensaio realizado não foram observadas diferenças significativas entre as amostras com e sem HK na eliminação de MPOs, levando a inferir que a enzima não atuou na biotransformação dos compostos avaliados neste estudo.

Figura 98 - Resultados do ensaio *in vitro* com a enzima hexoquinase para verificação da biotransformação enzimática de MPOs. Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Figura 99 - Degradação da glicose ao longo do ensaio in vitro com a enzima hexoquinase (HK). Resultados obtidos durante a operação do reator hidrolítico / acidogênico

Fonte: Autoria própria.

Gonzalez-Gil, Carballa e Lema (2017) avaliaram o cometabolismo enzimático atuante na biotransformação de vários micropoluentes orgânicos durante a metanogênese. Por meio de ensaios in vitro com a enzima acetato-quinase, os autores constataram que ela atuou na biotransformação cometabólica de vários MPOs, tais como galaxolide, naproxeno, nonilfenol, octilfenol, ibuprofeno, diclofenaco, bisfenol-A e triclosan. A enzima atua especificamente na fosforilação do acetato para acetil-fosfato durante a metanogênese acetoclástica. Foi provado, portanto, que ocorre da mesma forma, a fosforilação de compostos que contêm grupos carboxílicos ou hidroxila em sua estrutura molecular, conduzindo, assim, à biotransformação enzimática.

Vale ressaltar que as etapas hidrolítica e acidogênica possuem diversas outras enzimas envolvidas no processo. Portanto, estudos posteriores são necessários a fim de determinar potenciais mecanismos enzimáticos atuantes na biotransformação dos MPOs durante essas etapas da digestão anaeróbia.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os reatores anaeróbios de leito fixo ordenado (RALFO) e empacotado (RALFE) com espuma de poliuretano como material suporte foram capazes de remover os antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina, e a matéria orgânica (DQO) com alta eficiência em TDH de 12 h e aplicando esgoto lab-made – SMX: $93 \pm 4 \%$; CIP: $85 \pm 10 \%$; DQO: $93 \pm 2 \%$. O RALFO mostrou maior potencial de aplicação em termos operacionais e econômicos, uma vez que apresentou menor quantidade de material suporte e performance equivalente ou superior comparado ao RALFE. A diminuição do TDH para 4 horas foi prejudicial ao desempenho dos reatores, dado pela diminuição da eficiência de remoção – SMX: $69 \pm 7 \%$ no RALFE e $81 \pm 7 \%$ no RALFO; CIP: $66 \pm 8 \%$ no RALFE e $64 \pm 8 \%$ no RALFO; DQO: $79 \pm 6 \%$ no RALFE e $88 \pm 5 \%$ no RALFO, possivelmente devido à diminuição do tempo de contato substrato-biomassa no biofilme. A diminuição do TDH não impactou na constante cinética de decaimento dos compostos, porém a concentração residual resultante foi maior. A presença dos fármacos nas concentrações afluentes empregadas não trouxe impacto sobre a produção e rendimento de metano, mesmo nas maiores cargas aplicadas pela diminuição do TDH.

A aplicação de esgoto doméstico em TDH de 12 h conduziu a uma queda da eficiência do sistema – SMX: $77 \pm 9 \%$ no RALFE e $73 \pm 13 \%$ no RALFO; CIP: $67 \pm 19 \%$ no RALFE e $72 \pm 14 \%$ no RALFO; DQO: $80 \pm 7 \%$. A matriz complexa do esgoto levou à alteração da comunidade microbiana no leito dos reatores, diminuindo a população de arqueias metanogênicas, sobretudo hidrogenotróficas, e de bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, que foram associadas à biodegradação dos antibióticos. Ademais, com essa alteração, houve redução significativa da produção e rendimento de metano. A diminuição do desempenho dos reatores com esgoto sanitário também foi observada pelos menores valores de constante cinética aparente de remoção (k^{app}) e constante de biodegradação (k_{bio}), acompanhadas de maior concentração residual efluente, comparado à operação com esgoto lab-made.

A remoção de CIP foi influenciada pelo mecanismo de sorção, o que foi evidenciado pelo alto $\log K_D$ obtido (2,6 a 2,8 L kg⁻¹SS). Entretanto, em termos de contribuição efetiva na eliminação do fármaco, a sorção pode ser negligenciada neste caso, sendo a remoção praticamente devida a biodegradação, o que ocorreu também para SMX.

Considerando os aspectos ecotoxicológicos, o efluente dos reatores não causou impactos agudos e crônicos significativos sobre o organismo *Chironomus sancticaroli*. Por meio de ensaios de atividade antimicrobiana também não foram observados impactos no crescimento

de microrganismos tipicamente encontrados nos sistemas de tratamento biológico - *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* e *Escherichia coli*.

Os produtos de transformação identificados a partir da biodegradação anaeróbia do SMX apresentaram alterações no anel isoxazol, enquanto os metabólitos da CIP mostraram alterações do anel piperazina, no grupo ciclopropil e na ligação C–F. As estruturas moleculares propostas destes produtos evidenciam que a molécula da sulfonamida e quinolona permaneceram intactas, podendo os fármacos estarem ainda bioativos.

Por meio da avaliação da remoção de vários micropoluentes orgânicos em condição acidogênica, foi possível constatar que as diferentes etapas da digestão anaeróbia podem atuar de maneira distinta sobre a biotransformação dos compostos. Durante a etapa acidogênica, a biotransformação de fragrâncias sintéticas e dos antibióticos macrolídeos foi favorecida. Constatou-se, portanto, que a separação de fases na digestão anaeróbia pode otimizar a degradação de micropoluentes emergentes.

Os reatores anaeróbios de leito fixo com espuma de poliuretano são uma tecnologia promissora para remover compostos recalcitrantes, como os antibióticos sulfonamidas e fluoroquinolonas, com alta eficiência aplicando baixo TDH e podem ser aplicados com sucesso no tratamento de águas residuárias domésticas.

7. SUGESTÕES E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- **Avaliação da dessorção da ciprofloxacina na matriz sorvente.** Por meio deste trabalho foi possível verificar o alto potencial de sorção da fluoroquinolona na biomassa anaeróbia. Maiores concentrações afluentes de CIP poderiam resultar em maior eliminação de CIP por meio da sorção conduzindo à maior concentração efluente do fármaco, sobretudo se a concentração de sólidos na saída do reator for expressiva. Tem-se, portanto, que a biomassa acaba se comportando como um potencial reservatório do antibiótico, e os impactos disso são desconhecidos. Para elucidar esses possíveis impactos, estudos de dessorção do fármaco devem ser conduzidos a fim de avaliar um possível aumento da concentração de CIP efluente ao longo do tempo.
- **Monitoramento dos produtos de degradação.** Alguns produtos de degradação (PDs) anaeróbia de SMX e CIP foram identificados neste estudo. Entretanto, a quantificação desses produtos ao longo do tempo e do perfil espacial dos reatores não foi possível. Sugere-se investigar a possibilidade de aquisição de padrões analíticos para os PDs identificados, a fim de quantificá-los ao longo da operação dos reatores, bem como estabelecer rotas metabólicas de degradação. A avaliação dos impactos de metabólitos de fármacos no ambiente ainda é desconhecida, e técnicas de eliminação para os mesmos nos sistemas biológicos representa um vasto campo de pesquisa a ser explorado.
- **Ensaio ecotoxicológicos.** Nesse trabalho foram conduzidos ensaios preliminares de ecotoxicologia com enfoque para os antibióticos SMX e CIP. Sugere-se avaliar, por meio de ensaios crônicos de longa duração, possíveis alterações genéticas ou no desenvolvimento / ciclo de vida dos organismos-teste. Alguns endpoints ecotoxicológicos que poderiam ser utilizados para *Chironomus sancticaroli*, por exemplo, é o comprimento larval e da asa dos adultos, a taxa de fecundidade, número de desovas por ciclo, que poderiam dar indícios de possíveis alterações genéticas nos organismos testados. Outro estudo que poderia ser conduzido é a avaliação do efeito da diluição do efluente sobre a mortalidade / desenvolvimento de organismos-teste como *Allonais inaequalis*, que não apresentaram desenvolvimento no efluente bruto dos reatores RALFE e RALFO.

- **Avaliação da etapa acidogênica sobre a biotransformação de fármacos.** Na presente pesquisa foi evidenciado que as diferentes etapas da digestão anaeróbia podem atuar de maneira distinta na eliminação de micropoluentes orgânicos. Sugere-se avaliar a digestão anaeróbia com separação de fases, de forma a otimizar a biodegradação de fármacos, bem como diminuir o impacto dos mesmos sobre a metanogênese. Outro ponto de interesse neste caso é a avaliação do impacto dos micropoluentes orgânicos sobre a produção de biogás, tanto na produção de hidrogênio durante a fase acidogênica, quanto na produção de metano.
- **Avaliação do cometabolismo enzimático.** Estudos recentes têm apontado que a biotransformação de micropoluentes orgânicos nos sistemas biológicos é mediada por mecanismos enzimáticos estabelecidos pelos microrganismos presentes no meio. Sugere-se identificar as possíveis enzimas presentes nas diferentes rotas metabólicas da digestão anaeróbia e, por meio de ensaios *in vitro* com enzimas comerciais, avaliar a efetividade de atuação dos mecanismos enzimáticos sobre a eliminação cometabólica dos fármacos.

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DO TRABALHO

- Artigos publicados em revistas internacionais

- Rodrigo Braz Carneiro, Carolina Aparecida Sabatini, Álvaro José dos Santos Neto, Marcelo Zaiat. **Feasibility of anaerobic packed and structured-bed reactors for sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal.** Science of the Total Environment, v. 678, p. 419–429, 2019.
- Rodrigo Braz Carneiro, Lorena Gonzalez-Gil, Yudy Andrea Londoño, Marcelo Zaiat, Marta Carballa, Juan Manoel Lema. **Acidogenesis is a key step in the anaerobic biotransformation of organic micropollutants.** Submetido em Journal of Hazardous Materials. 2019.

- Apresentação Oral em Congresso Internacional

- Rodrigo Braz Carneiro, Lorena Gonzalez-Gil, Marcelo Zaiat, Marta Carballa, Juan Manoel Lema. **Hydrolysis or acidogenesis? Who plays a major role on the biotransformation of organic micropollutants?** “16th World Congress on Anaerobic Digestion” realizado em Delft, Holanda, 2019.
- Rodrigo Braz Carneiro, Álvaro José dos Santos Neto, Marcelo Zaiat. **Evaluation of Antibiotic Sulfamethoxazole Removal in Fixed Packed and Structured Bed Anaerobic Bioreactors.** “XII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion” realizado em Cusco, Peru, 2016.

- Apresentação de Poster em Congresso Internacional

- Rodrigo Braz Carneiro, Carolina Aparecida Sabatini, Caio Minoru Mukaeda, Álvaro José dos Santos Neto, Marcelo Zaiat. **Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin removal in anaerobic structured bed reactor: effect of substrate and hydraulic retention time.** “16th World Congress on Anaerobic Digestion” realizado em Delft, Holanda, 2019.

- Rodrigo Braz Carneiro, Carolina Aparecida Sabatini, Guilherme Miola Titato, Álvaro José dos Santos Neto, Marcelo Zaiat. **Identification of ciprofloxacin transformation products in anaerobic structured bed reactor applied to the sewage treatment.** “XVII Latin American Symposium on Chromatography and Related Techniques (COLACRO XVII)” realizado em Aracaju, Sergipe, Brasil, 2019.
- Rodrigo Braz Carneiro, Lorena Gonzalez-Gil, Marcelo Zaiat, Marta Carballa, Juan Manoel Lema. **Effect of pH on the biotransformation of antibiotics during starch fermentation.** “SETAC Europe 28th Annual Meeting” realizado em Roma, Itália, 2018.
- Rodrigo Braz Carneiro, Tanare Cambraia Ribeiro Ferreira, Álvaro José dos Santos Neto, Marcelo Zaiat. **Sulfamethoxazole biodegradation in a fixed bed anaerobic reactor with polyurethane foam as support material: focus on the identification of the transformation products.** “6th International Conference on Emerging Contaminants (EmCon)” realizado em Oslo, Noruega, 2018.
- Rodrigo Braz Carneiro, Caio Minoru Mukaeda, Álvaro José dos Santos Neto, Marcelo Zaiat. **Influence of hydraulic retention time on the removal and removal kinetics of antibiotics Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin in an anaerobic packed bed reactor.** “International IWA conference on sustainable solutions for small water and wastewater treatment systems (S2small2017)” realizado em Nantes, França, 2017.
- Rodrigo Braz Carneiro, Carolina Aparecida Sabatini, Caio Minoru Mukaeda, Álvaro José dos Santos Neto, Marcelo Zaiat. **Removal of antibiotic Ciprofloxacin by Fixed Packed and Structured Bed Anaerobic Bioreactors.** “14th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies (LET)” realizado em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2017.

- Apresentação de Poster em Congresso Nacional

- Rodrigo Braz Carneiro, Fabrício Motteran, Eloisa Pozzi, Marcelo Zaiat. **Molecular biology analysis of adhered biomass in polyurethane foam used as support material in anaerobic packed bed reactor to remove sulfamethoxazole and ciprofloxacin from domestic sewage.** “30^o Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM)” realizado em Maceió, Alagoas, Brasil, 2019.

- Rodrigo Braz Carneiro, Eloisa Pozzi, Marcelo Zaiat. **Evaluation of the antimicrobial activity of the Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin on *Ochrobactrum sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingomonas sp.* and *Escherichia coli* in synthetic wastewater simulating sanitary sewage applied in anaerobic reactor.** “29º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM)” realizado em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2017.

REFERÊNCIAS

- ABCAM**. Disponível em: <<https://www.abcam.com/hexokinase-activity-assay-kit-colorimetric-ab136957.html>>.
- ABEGGLEN, C.; JOSS, A.; MCARDELL, C. S.; FINK, G.; SCHLÜSENER, M. P.; TERNES, T. A.; SIEGRIST, H.; MCARDELL, C. S. The fate of selected micropollutants in a single-house MBR. **Water Research**, v. 43, n. 7, p. 2036–2046, 2009.
- ACHERMANN, S.; BIANCO, V.; MANSFELDT, C. B.; VOGLER, B.; KOLVENBACH, B. A.; CORVINI, P. F. X.; FENNER, K. Biotransformation of Sulfonamide Antibiotics in Activated Sludge: The Formation of Pterin-Conjugates Leads to Sustained Risk. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 6265–6274, 2018.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, n. 5, p. 406–414, 2014.
- AEMIG, Q.; CHÉRON, C.; DELGENÈS, N.; JIMENEZ, J.; HOUOT, S.; STEYER, J. P.; PATUREAU, D. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in sludge organic matter pools as a driving force of their fate during anaerobic digestion. **Waste Management**, v. 48, p. 389–396, 2016.
- AL-MAADHEED, S.; GOKTEPE, I.; LATIFF, A. B. A.; SHOMAR, B. Antibiotics in hospital effluent and domestic wastewater treatment plants in Doha, Qatar. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, p. 60–68, 2019.
- ALVARINO, T.; NASTOLD, P.; SUAREZ, S.; OMIL, F.; CORVINI, P. F. X.; BOUJU, H. Role of biotransformation, sorption and mineralization of ¹⁴C-labelled sulfamethoxazole under different redox conditions. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 706–715, 2016a.
- ALVARINO, T.; SUÁREZ, S.; GARRIDO, M.; LEMA, J. M.; OMIL, F. A UASB reactor coupled to a hybrid aerobic MBR as innovative plant configuration to enhance the removal of organic micropollutants. **Chemosphere**, v. 144, p. 452–458, 2016b.
- ALVARINO, T.; SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 506–513, 2014.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st. ed. American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation: Washington, DC, USA., 2005.
- ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 117–129, 2004.
- ANZOLA-ROJAS, M. del P.; ZAIAT, M. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂energy production from wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2016.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. D. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto : revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.
- ARAÚJO, H. A. S. de. **A utilização de pérolas de quitosana para adsorção de cromo hexavalente em coluna de leito fixo**. 2018. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., 2018.
- ARAÚJO JR., M. M. De; ZAIAT, M. An upflow fixed-bed anaerobic – aerobic reactor for removal of organic matter and nitrogen from L-lysine plant wastewater. **Canadian Journal of Civil Engineering (Print)**, v. 36, p. 1085–1094, 2009.

ARIAS, A.; ALVARINO, T.; ALLEGUE, T.; SUÁREZ, S.; GARRIDO, J. M.; OMIL, F. An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient macro and micropollutant removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, n. July, p. 113–120, 2018.

ATKINS, P. J.; HERBERT, T. O.; JONES, N. B. Kinetic studies on the decomposition of erythromycin A in aqueous acidic and neutral buffers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 30, n. 2–3, p. 199–207, 1986.

BAENA, S.; FARDEAU, M. L.; LABAT, M.; OLLIVIER, B.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C. *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. **Anaerobe**, v. 4, n. 5, p. 241–250, 1998.

BAENA, S.; FARDEAU, M.; OLLIVIER, B.; LABAT, M.; T, P.; DE, A. *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 975–982, 1999.

BALCH, W. E.; FOX, G. E.; MAGRUM, L. J.; WOESE, C. R.; WOLFE, R. S. Methanogens_Reevaluation of a unique biological group. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 260–296, 1979.

BATT, A. L.; KIM, S.; AGA, D. S. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. **Chemosphere**, v. 68, p. 428–435, 2007.

BATTUMUR, U.; YOON, Y. M.; KIM, C. H. Isolation and characterization of a new methanobacterium formicum KOR-1 from an anaerobic digester using pig slurry. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 4, p. 586–593, 2016.

BERGERSEN, O.; HANSEN, K. Ø.; VASSKOG, T. Anaerobic treatment of sewage sludge containing selective serotonin reuptake inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 325–332, 2012.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Pharmaceutical drugs in the environment. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BLETSSOU, A. A.; JEON, J.; HOLLENDER, J.; ARCHONTAKI, E.; THOMAIDIS, N. S. Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 32–44, 2015.

BOONE, D. R.; BRYANT, M. P. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolnii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 626–632, 1980.

BOXALL, A. B. A.; RUDD, M. A.; BROOKS, B. W.; CALDWELL, D. J.; CHOI, K.; HICKMANN, S.; INNES, E.; OSTAPYK, K.; STAVELEY, J. P.; VERSLYCKE, T.; ANKLEY, G. T.; BEAZLEY, K. F.; BELANGER, S. E.; BERNINGER, J. P.; CARRQUIRIBORDE, P.; COORS, A.; DELEO, P. C.; DYER, S. D.; ERICSON, J. F.; GAGNÉ, F.; GIESY, J. P.; GOVIN, T.; HALLSTROM, L.; KARLSSON, M. V.; LARSSON, D. G. J.; LAZORCHAK, J. M.; MASTROCCO, F.; MCLAUGHLIN, A.; MCMASTER, M. E.; MEYERHOFF, R. D.; MOORE, R.; PARROTT, J. L.; SNAPE, J. R.; MURRAY-SMITH, R.; SERVOS, M. R.; SIBLEY, P. K.; STRAUB, J. O.; SZABO, N. D.; TOPP, E.; TETREAU, G. R.; TRUDEAU, V. L.; KRAAK, G. Van Der. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 9, p. 1221–1229, 2012.

BRAIN, R. A.; SIBLEY, P. K.; JOHNSON, D. J.; SOLOMON, K. R.; RICHARDS, S. M.; SANDERSON, H.; BRAIN, R. A. Effects of 25 Pharmaceutical Compounds To Lemna Gibba Using a Seven-Day Static-Renewal Test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 371, 2004.

BRANDT, E. M. F.; DE QUEIROZ, F. B.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 718–726, 2013.

BRÄUER, S. L.; CADILLO-QUIROZ, H.; WARD, R. J.; YAVITT, J. B.; ZINDER, S. H. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 45–52, 2011.

BROWN, K. D.; KULIS, J.; THOMSON, B.; CHAPMAN, T. H.; MAWHINNEY, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 366, n. 2–3, p. 772–783, 2006.

BUTKOVSKYI, A.; SEVENOU, L.; MEULEPAS, R. J. W.; HERNANDEZ LEAL, L.; ZEEMAN, G.; RIJNAARTS, H. H. M. Micropollutant removal from black water and grey water sludge in a UASB-GAC reactor. **Water Science and Technology**, v. 77, n. 4, p. 1137–1148, 2018.

CADILLO-QUIROZ, H.; YAVITT, J. B.; ZINDER, S. H. Methanosphaerula palustris gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 928–935, 2009.

CAMARGO, E. F. M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. Treatment of low-strength wastewater using immobilized biomass in a sequencing batch external loop reactor: Influence of the medium superficial velocity on the stability and performance. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 3, p. 267–275, 2002.

CAMILOTI, P. R.; MOCKAITIS, G.; DOMINGUES RODRIGUES, J. A.; RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC, M. H.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, 2014.

CARBALLA, M.; FINK, G.; OMIL, F.; LEMA, J. M.; TERNES, T. Determination of the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. **Water Research**, v. 42, n. 1–2, p. 287–295, 2008.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; ALDER, A. C.; LEMA, J. M. Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. **Water Science and Technology**, v. 53, n. 8, p. 109–117, 2006.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. **Water Research**, v. 39, n. 19, p. 4790–4796, 2005.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M.; LLOMPART, M.; GARCÍA-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GÓMEZ, M.; TERNES, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2918–2926, 2004.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; TERNES, T.; LEMA, J. M. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. **Water Research**, v. 41, n. 10, p. 2139–2150, 2007.

CARMONA, M.; ZAMARRO, M. T.; BLAZQUEZ, B.; DURANTE-RODRIGUEZ, G.; JUAREZ, J. F.; VALDERRAMA, J. A.; BARRAGAN, M. J. L.; GARCIA, J. L.; DIAZ, E. Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 1, p. 71–133, 2009.

CARNEIRO, R. B.; SABATINI, C. A.; SANTOS-NETO, Á. J.; ZAIAT, M. Feasibility of anaerobic packed and structured-bed reactors for sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal from domestic sewage. **Science of the Total Environment**, v. 678, p. 419–429, 2019.

CASAS, M. E.; CHHETRI, R. K.; OOI, G.; CHRISTENSSON, M.; KRAGELUND, C.; BESTER, K.; HANSEN, K. M. S.; LITTY, K.; ANDERSEN, H. R. Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by a hybrid biofilm and activated sludge system (Hybas). **Science of The Total Environment**, v. 530–531, p. 383–392, 2015.

CETECIOGLU, Z.; INCE, B.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; INCE, O.; ORHON, D. Biodegradation and reversible inhibitory impact of sulfamethoxazole on the utilization of volatile fatty acids during anaerobic treatment of pharmaceutical industry wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 667–674, 2015.

CETECIOGLU, Z.; INCE, B.; ORHON, D.; INCE, O. Anaerobic sulfamethoxazole degradation is driven by homoacetogenesis coupled with hydrogenotrophic methanogenesis. **Water Research**, v. 90, p. 79–89, 2016.

CHATILA, S.; AMPARO, M. R.; CARVALHO, L. S.; PENTEADO, E. D.; TOMITA, I. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; LIMA GOMES, P. C. F.; ZAIAT, M. Sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal using a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 37, n. 7, p. 847–853, 2016.

CHELLIAPAN, S.; WILBY, T.; SALLIS, P. J. Effect of hydraulic retention time on up-flow anaerobic stage reactor performance at constant loading in the presence of antibiotic Tylosin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 51–61, 2011.

CHELLIAPAN, S.; WILBY, T.; YUZIR, A.; SALLIS, P. J. Influence of organic loading on the performance and microbial community structure of an anaerobic stage reactor treating pharmaceutical wastewater. **Desalination**, v. 271, n. 1–3, p. 257–264, 2011.

Chemaxon Database. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com>>.

ChemSketch v. **11.0**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/download.php>>.

CHEN, S.; LIU, X.; DONG, X. Syntrophobacter sulfatireducens sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1319–1324, 2005.

CHERNICHARO, C. A. de L. Anaerobic Reactors. In: **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. London: IWA Publishing, 2015. 4.

CHERNICHARO, C. A. L.; VAN LIER, J. B.; NOYOLA, A.; BRESSANI RIBEIRO, T. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 649–679, 2015.

CHOI, K. J.; KIM, S. G.; KIM, C. won; KIM, S. H. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 977–984, 2007.

CHOVATIA, M.; SIKORSKI, J.; SCHRÖDER, M.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; TICE, H.; DEL RIO, T. G.; COPELAND, A.; CHENG, J. F.; LUCAS, S.; CHEN, F.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; OVCHINNIKOVA, G.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y. J.; JEFFRIES, C. D.; CHAIN, P.; SAUNDERS, E.; DETTER, J. C.; BRETTIN, T.; ROHDE, M.; GÖKER, M.; SPRING, S.; BRISTOW, J.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P.; EISEN, J. A. Complete genome sequence of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* type strain (Su883 T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 1, n. 3, p. 254–261, 2009.

CIRJA, M.; IVASHECHKIN, P.; SCHÄFFER, A.; CORVINI, P. F. X. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 61–78, 2008.

CLARA, M.; GANS, O.; WINDHOFER, G.; KRENN, U.; HARTL, W.; BRAUN, K.; SCHARF, S.; SCHEFFKNECHT, C. Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 82, n. 8, p. 1116–1123, 2011.

CLARA, M.; KREUZINGER, N.; STRENN, B.; GANS, O.; KROISS, H. The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. **Water Research**, v. 39, n. 1, p. 97–106, 2005a.

CLARA, M.; STRENN, B.; GANS, O.; MARTINEZ, E.; KREUZINGER, N.; KROISS, H. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 39, n. 19, p. 4797–4807, 2005b.

COHEN, A.; BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G.; VAN DEURSEN, A. Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose-I maximum COD-turnover rate during continuous operation. **Water Research**, v. 14, p. 1439–1448, 1980.

- CORBI, J. J.; FROEHLICH, C. G.; STRIXINO, S. T.; DOS SANTOS, A. Bioaccumulation of metals in aquatic insects of streams located in areas with sugar cane cultivation. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 644–648, 2010.
- CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 7–11, 2015.
- COSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 1–4, p. 218–223, 2005.
- CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 367, n. 1, p. 23–41, 2006.
- CUEL, M. F.; KWONG, W. H.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Solution of a heterogeneous modeling of a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor by the sequencing method. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 38, n. 4, p. 415–421, 2011.
- DANTAS, R. F.; CONTRERAS, S.; SANS, C.; ESPLUGAS, S. Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, n. 3, p. 790–794, 2008.
- DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907–938, 1999.
- DE GRAAFF, M. S.; VIENO, N. M.; KUJAWA-ROELEVELD, K.; ZEEMAN, G.; TEMMINK, H.; BUISMAN, C. J. N. Fate of hormones and pharmaceuticals during combined anaerobic treatment and nitrogen removal by partial nitrification-anammox in vacuum collected black water. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 375–383, 2011.
- DE WITTE, B.; DEWULF, J.; DEMEESTERE, K.; VAN LANGENHOVE, H. Ozonation and advanced oxidation by the peroxone process of ciprofloxacin in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2–3, p. 701–708, 2009.
- DE WITTE, B.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K.; DEWULF, J. Advanced oxidation of pharmaceuticals: Chemical analysis and biological assessment of degradation products. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 215–242, 2011.
- DEL FIOLE, F. D. S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I. De; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 68–72, 2010.
- DELFORNO, T. P.; LACERDA JÚNIOR, G. V.; NORONHA, M. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, V. M. Microbial diversity of a full-scale UASB reactor applied to poultry slaughterhouse wastewater treatment: integration of 16S rRNA gene amplicon and shotgun metagenomic sequencing. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 3, p. 1–12, 2017.
- DES MES, T. Z. D.; KUJAWA-ROELEVELD, K.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. Anaerobic biodegradation of estrogens - Hard to digest. **Water Science and Technology**, v. 57, n. 8, p. 1177–1182, 2008.
- DODDEMA, H. J.; VOGELS, G. D. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 752–756, 1978.
- DRILLIA, P.; DOKIANAKIS, S. N.; FOUNTOULAKIS, M. S.; KORNAROS, M.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 259–265, 2005.
- DU, J.; FAN, Y.; QIAN, X. Occurrence and behavior of pharmaceuticals in sewage treatment plants in eastern China. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 9, n. 4, p. 725–730, 2015.
- DUAN, X.; WANG, X.; DAI, L.; FENG, L.; YAN, Y.; ZHOU, Q. Simultaneous enhancement of nonylphenol biodegradation and short-chain fatty acids production in waste activated sludge under acidogenic conditions. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 24–31, 2019.

EGUCHI, K.; NAGASE, H.; OZAWA, M.; ENDOH, Y. S.; GOTO, K.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K.; YOSHIMURA, H. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**, v. 57, n. 11, p. 1733–1738, 2004.

ESPERANZA, M.; SUIDAN, M. T.; MARFIL-VEGA, R.; GONZALEZ, C.; SORIAL, G. A.; MCCAULEY, P.; BRENNER, R. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. **Chemosphere**, v. 66, n. 8, p. 1535–1544, 2007.

ESTRADA-ARRIAGA, E. B.; MIJAYLOVA, P. N. Influence of operational parameters (sludge retention time and hydraulic residence time) on the removal of estrogens by membrane bioreactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 7, p. 1121–1128, 2011.

FAN, C. H.; YANG, C. W.; CHANG, B. V. Anaerobic degradation of sulfamethoxazole by mixed cultures from swine and sewage sludge. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 40, n. 2, p. 210–218, 2019.

FANG, H. H. P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 87–93, 2002.

FENG, N.-X.; YU, J.; XIANG, L.; YU, L.-Y.; ZHAO, H.-M.; MO, C.-H.; LI, Y.-W.; CAI, Q.-Y.; WONG, M.-H.; LI, Q. X. Co-metabolic degradation of the antibiotic ciprofloxacin by the enriched bacterial consortium XG and its bacterial community composition. **Science of The Total Environment**, v. 665, p. 41–51, 2019.

FISCHER, K.; MAJEWSKY, M. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 15, p. 6583–6597, 2014.

GAO, J.; HUANG, J.; CHEN, W.; WANG, B.; WANG, Y.; DENG, S.; YU, G. Fate and removal of typical pharmaceutical and personal care products in a wastewater treatment plant from Beijing: a mass balance study. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 10, n. 3, p. 491–501, 2016.

GARCÍA-MORALES, J. L.; NEBOT, E.; ROMERO, L. I.; SALES, D. Comparison Between Acidogenic and Methanogenic Inhibition Caused by Linear Alkylbenzene-Sulfonate (LAS). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 15, n. 1, p. 13–19, 2001.

GARCÍA GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Removal of sulfonamide antibiotics upon conventional activated sludge and advanced membrane bioreactor treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 5, p. 1505–1515, 2012.

GASC, J. C.; D'AMBRIERES, S. G.; LUTZ, A. New ether oxime derivatives a structure-activity of erythromycin a relationship study. **The Journal of Antibiotics**, v. 44, n. 3, p. 313–330, 1990.

GHATTAS, A. K.; FISCHER, F.; WICK, A.; TERNES, T. A. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. **Water Research**, v. 116, p. 268–295, 2017.

GIJZEN, H. J.; SCHOENMAKERS, T. J. M.; CAERTELING, C. G. M.; VOGELS, G. D. Anaerobic degradation of papermill sludge in a two-phase digester containing rumen microorganisms and colonized polyurethane foam. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 1, p. 61–66, 1988.

GÖBEL, A.; MCARDELL, C. S.; SUTER, M. J.-F.; GIGER, W. Trace Determination of Macrolide and Sulfonamide Antimicrobials, a Human Sulfonamide Metabolite, and Trimethoprim in Wastewater Using Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 16, p. 4756–4764, 2004.

GÖBEL, A.; THOMSEN, A.; MCARDELL, C. S.; JOSS, A.; GIGER, W. Occurrence and Sorption Behavior of Sulfonamides, Macrolides, and Trimethoprim in Activated Sludge Treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 11, p. 3981–3989, 2005.

GODOI, L. A. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater. **Water Science & Technology**, v. 72, n. 9, p. 1644–1652, 2015.

GOLET, E. M.; XIFRA, I.; SIEGRIST, H.; ALDER, A. C.; GIGER, W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 15, p. 3243–3249, 2003.

GONZALEZ-GIL, L.; CARBALLA, M.; LEMA, J. M. Cometabolic Enzymatic Transformation of Organic Micropollutants under Methanogenic Conditions. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 2963–2971, 2017.

GONZALEZ-GIL, L.; MAURICIO-IGLESIAS, M.; SERRANO, D.; LEMA, J. M.; CARBALLA, M. Role of methanogenesis on the biotransformation of organic micropollutants during anaerobic digestion. **Science of the Total Environment**, v. 622–623, p. 459–466, 2018.

GONZALEZ-GIL, L.; PAPA, M.; FERETTI, D.; CERETTI, E.; MAZZOLENI, G.; STEIMBERG, N.; PEDRAZZANI, R.; BERTANZA, G.; LEMA, J. M.; CARBALLA, M. Is anaerobic digestion effective for the removal of organic micropollutants and biological activities from sewage sludge? **Water Research**, v. 102, p. 211–220, 2016.

GRABER, J. R.; BREZNAK, J. a. Physiology and Nutrition of *Treponema primitia*, an H₂/ CO₂-Acetogenic Spirochete from Termite Hindguts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1307–1314, 2004.

GRANDCLÉMENT, C.; SEYSSIECQ, I.; PIRAM, A.; WONG-WAH-CHUNG, P.; VANOT, G.; TILIACOS, N.; ROCHE, N.; DOUMENQ, P. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. **Water Research**, v. 111, p. 297–317, 2017.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 678–690, 2006.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the ebro river basin (northeast Spain). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1553–1562, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUJER, W.; ZEHNDER, A. J. B. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. **Water, Science and Technology**, v. 15, p. 127–167, 1983.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; LÜTZHØFT, H. C. H.; JØRGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, 1998.

HAMMILL, T. B.; CRAWFORD, R. L. Degradation of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb) by *Clostridium bifermentans* KMR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1842–1846, 1996.

HARMSSEN, H. J. M.; VAN KUIJK, B. L. M.; PLUGGE, C. M.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M.; STAMS, A. J. M. *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1383–1387, 1998.

HASHIMOTO, T.; ONDA, K.; NAKAMURA, Y.; TADA, K.; MIYA, A.; MURAKAMI, T. Comparison of natural estrogen removal efficiency in the conventional activated sludge process and the oxidation ditch process. **Water Research**, v. 41, n. 10, p. 2117–2126, 2007.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment - a review of recent research data. **Toxicology letters**, v. 131, p. 5–17, 2002.

HERNANDEZ-EUGENIO, G.; FARDEAU, M.-L.; CAYOL, J.-L.; PATEL, B. K. C.; THOMAS, P.; MACARIE, H.; GARCIA, J.-L.; OLLIVIER, B. *Clostridium thiosulfatireducens* sp. nov., a proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1461–1468, 2002.

HERNANDEZ-RAQUET, G.; SOEF, A.; DELGENÈS, N.; BALAGUER, P. Removal of the endocrine disrupter nonylphenol and its estrogenic activity in sludge treatment processes. **Water Research**, v. 41, n. 12, p. 2643–2651, 2007.

HERNANDO, M. D.; DE VETTORI, S.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. **Chemosphere**, v. 68, n. 4, p. 724–730, 2007.

HIGASHI, E. S. **Bioensaios de toxicidade da água do efluente de biofiltros em areia como ferramenta de avaliação da qualidade da água**. 2016. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., 2016.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1, p. 109–118, 1999.

HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 10, p. 2304–2347, 2011.

HU, L.; FLANDERS, P. M.; MILLER, P. L.; STRATHMANN, T. J. Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO₂ photocatalysis. **Water Research**, v. 41, n. 12, p. 2612–2626, 2007.

HUANG, C.-H.; RENEW, J.; L. SMEBY, K.; PINKSTON, K.; L. SEDLAK, D. Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. **J. Contemp. Water Res. Educ.**, v. 120, 2011.

HUSSY, I.; HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous Fermentative Hydrogen Production from a Wheat Starch Co-Product by Mixed Microflora. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 619–626, 2003.

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

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PASCARELLA, L.; PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment**, v. 346, n. 1–3, p. 87–98, 2005.

ITO, T.; YOSHIGUCHI, K.; ARIESYADY, H. D.; OKABE, S. Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to Synergistes group 4 in anaerobic digester sludge. **ISME Journal**, v. 5, n. 12, p. 1844–1856, 2011.

JACKSON, B. E.; BHUPATHIRAJU, V. K.; TANNER, R. S.; WOESE, C. R.; MCINERNEY, M. J. *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen- using microorganisms. **Archives of Microbiology**, v. 171, n. 2, p. 107–114, 1999.

JIA, A.; WAN, Y.; XIAO, Y.; HU, J. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. **Water Research**, v. 46, n. 2, p. 387–394, 2012.

JIA, Y.; KHANAL, S. K.; SHU, H.; ZHANG, H.; CHEN, G. H.; LU, H. Ciprofloxacin degradation in anaerobic sulfate-reducing bacteria (SRB) sludge system: Mechanism and pathways. **Water Research**, v. 136, p. 64–74, 2018.

JIA, Y.; KHANAL, S. K.; ZHANG, H.; CHEN, G. H.; LU, H. Sulfamethoxazole degradation in anaerobic sulfate-reducing bacteria sludge system. **Water Research**, v. 119, p. 12–20, 2017.

JOHNSON, A. C.; AERNI, H. R.; GERRITSEN, A.; GIBERT, M.; GIGER, W.; HYLLAND, K.; JÜRGENS, M.; NAKARI, T.; PICKERING, A.; SUTER, M. J. F.; SVENSON, A.; WETTSTEIN, F. E. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. **Water Research**, v. 39, n. 1, p. 47–58, 2005.

JOHNSON, A. C.; WHITE, C.; BHARDWAJ, L.; JURGENS, M. D. Potential for octylphenol to biodegrade in some english rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 2486–2492, 2000.

JØRGENSEN, S. E.; HALLING-SØRENSEN, B. Drugs in the Environment. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 691–699, 2000.

JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T.; RICHLE, P. R.; SIEGRIST, H. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 11, p. 3047–3055, 2004.

JOSS, A.; KELLER, E.; ALDER, A. C.; GO, A.; MCARDELL, C. S.; TERNES, T.; SIEGRIST, H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. **Water Research**, v. 39, p. 3139–3152, 2005.

JOSS, A.; ZABCZYNSKI, S.; GO, A.; HOFFMANN, B.; LO, D.; MCARDELL, C. S.; TERNES, T. A.; THOMSEN, A.; SIEGRIST, H. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. **Water Research**, v. 40, p. 1686–1696, 2006.

KARTHIKEYAN, K. G.; MEYER, M. T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. **Science of the Total Environment**, v. 361, n. 1–3, p. 196–207, 2006.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Research**, v. 43, n. 2, p. 363–380, 2009.

KASSOTAKI, E.; BUTTIGLIERI, G.; FERRANDO-CLIMENT, L.; RODRIGUEZ-RODA, I.; PIJUAN, M. Enhanced sulfamethoxazole degradation through ammonia oxidizing bacteria co-metabolism and fate of transformation products. **Water Research**, v. 94, p. 111–119, 2016.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 15, p. 1607–1616, 2004.

KIM, Y.; CHOI, K.; JUNG, J.; PARK, S.; KIM, P. G.; PARK, J. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International**, v. 33, n. 3, p. 370–375, 2007.

KOSJEK, T.; HEATH, E. Applications of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 807–820, 2008.

KRAH, D.; GHATTAS, A. K.; WICK, A.; BRÖDER, K.; TERNES, T. A. Micropollutant degradation via extracted native enzymes from activated sludge. **Water Research**, v. 95, p. 348–360, 2016.

KUMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. **Chemosphere**, v. 45, p. 957–969, 2001.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435–441, 2009.

LAU, K. W. K.; NG, C. Y. M.; REN, J.; LAU, S. C. L.; QIAN, P. Y.; WONG, P. K.; LAU, T. C.; WU, M. *Owenweeksia hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum “Bacteroidetes”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1051–1057, 2005.

LEAL, L. H.; VIENO, N.; TEMMINK, H.; ZEEMAN, G.; BUISMAN, C. J. N. Occurrence of xenobiotics in gray water and removal in three biological treatment systems. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 17, p. 6835–6842, 2010.

LESJEAN, B.; GNIRRS, R.; BUISSON, H.; KELLER, S.; TAZI-PAIN, A.; LUCK, F. Outcome of a 2-year investigation on enhanced biological nutrients removal and trace organics elimination in membrane bioreactor (MBR). **Water Science and Technology**, v. 52, n. 10–11, p. 453–460, 2005.

LEUNG, H. W.; MINH, T. B.; MURPHY, M. B.; LAM, J. C. W.; SO, M. K.; MARTIN, M.; LAM, P. K. S.; RICHARDSON, B. J. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. **Environment International**, v. 42, n. 1, p. 1–9, 2012.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. 3ª ed. São Paulo: Edgard Blücher., 2000.

LI, B.; ZHANG, T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 3468–3473, 2010.

LIMA GOMES, P. C. F.; TOMITA, I. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; ZAIAT, M. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 29, p. 8787–8801, 2015.

LIN, A. Y.; YU, T.; LATEEF, S. K. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 1163–1169, 2009.

LIN, C. Y.; CHANG, R. C. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 498–500, 1999.

LINDBERG, R. H.; OLOFSSON, U.; RENDAHL, P.; JOHANSSON, M. I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B. A. V. Behavior of Fluoroquinolones and Trimethoprim during Mechanical, Chemical, and Active Sludge Treatment of Sewage Water and Digestion of Sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 3, p. 1042–1048, 2006.

LIU, Z.; SUN, P.; PAVLOSTATHIS, S. G.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Inhibitory effects and biotransformation potential of ciprofloxacin under anoxic/anaerobic conditions. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 28–35, 2013.

LOGAN, B. E.; OH, S. E.; KIM, I. S.; VAN GINKEL, S. Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, n. 11, p. 2530–2535, 2002.

LOVLEY, D. R. The Hydrogen Economy of *Methanosarcina barkeri*: Life in the Fast Lane. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 20, p. 1–5, 2018.

LOVLEY, D. R.; UEKI, T.; ZHANG, T.; MALVANKAR, N. S.; SHRESTHA, P. M.; FLANAGAN, K. A.; AKLUJKAR, M.; BUTLER, J. E.; GILTEAUX, L.; ROTARU, A. E.; HOLMES, D. E.; FRANKS, A. E.; ORELLANA, R.; RISSO, C.; NEVIN, K. P. **Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications**. 1st. ed. Massachusetts, USA: Elsevier Ltd., 2011. v. 59

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F. I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MAILLER, R.; GASPERI, J.; CHEBBO, G.; ROCHER, V. Priority and emerging pollutants in sewage sludge and fate during sludge treatment. **Waste Management**, v. 34, n. 7, p. 1217–1226, 2014.

MAJEWSKY, M.; HORN, H.; YARGEAU, V.; WAGNER, D.; BRÄSE, S.; DELAY, M. Antibacterial Activity of Sulfamethoxazole Transformation Products (TPs): General Relevance for Sulfonamide TPs Modified at the para Position. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 10, p. 1821–1828, 2014.

MALMBORG, J.; MAGNÉR, J. Pharmaceutical residues in sewage sludge: Effect of sanitization and anaerobic digestion. **Journal of Environmental Management**, v. 153, p. 1–10, 2015.

MARTINS, N.; PEREIRA, R.; ABRANTES, N.; PEREIRA, J.; GONC, F.; MARQUES, C. R. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1167–1176, 2012.

- MAZZEI, T.; MINI, E.; NOVELLI, A.; PERITI, P. Chemistry and mode of action of macrolides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31, p. 1–9, 1993.
- MECKENSTOCK, R. U.; BOLL, M.; MOUTTAKI, H.; KOELSCHBACH, J. S.; CUNHA TAROUÇO, P.; WEYRAUCH, P.; DONG, X.; HIMMELBERG, A. M. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1–3, p. 92–118, 2016.
- MIÈGE, C.; CHOUBERT, J. M.; RIBEIRO, L.; EUSÈBE, M.; COQUERY, M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 5, p. 1721–1726, 2009.
- MIN, X.; LI, W.; WEI, Z.; SPINNEY, R.; DIONYSIOU, D. D.; SEO, Y.; TANG, C. J.; LI, Q.; XIAO, R. Sorption and biodegradation of pharmaceuticals in aerobic activated sludge system: A combined experimental and theoretical mechanistic study. **Chemical Engineering Journal**, v. 342, p. 211–219, 2018.
- MIRAN, W.; JANG, J.; NAWAZ, M.; SHAHZAD, A.; LEE, D. S. Biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by sulfamethoxazole acclimatized cultures in microbial fuel cells. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 1058–1065, 2018.
- MIRZAEI, R.; MESDAGHINIA, A.; HOSEINI, S. S.; YUNESIAN, M. Antibiotics in urban wastewater and rivers of Tehran, Iran: Consumption, mass load, occurrence, and ecological risk. **Chemosphere**, v. 221, p. 55–66, 2019.
- MITSCHER, L. A. Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 559–592, 2005.
- MOCKAITIS, G.; PANTOJA, J. L. R.; RODRIGUES, J. A. D.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, 2014.
- MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J. A. D.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Toxic effects of cadmium (Cd²⁺) on anaerobic biomass: Kinetic and metabolic implications. **Journal of Environmental Management**, v. 106, p. 75–84, 2012.
- MOHRING, S. A. I.; STRZYSCH, I.; FERNANDES, M. R. Degradation and Elimination of Various Sulfonamides during Anaerobic Fermentation: A Promising Step on the Way to Sustainable Pharmacy? - Environmental Science & Technology (ACS Publications). **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 7, p. 2569–2574, 2009.
- MONSALVO, V. M.; MCDONALD, J. A.; KHAN, S. J.; LE-CLECH, P. Removal of trace organics by anaerobic membrane bioreactors. **Water Research**, v. 49, p. 103–112, 2014.
- MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **Journal of Environmental Management**, v. 98, p. 163–167, 2012.
- MÜLLER, E.; SCHÜSSLER, W.; HORN, H.; LEMMER, H. Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen source. **Chemosphere**, v. 92, n. 8, p. 969–978, 2013.
- NARUMIYA, M.; NAKADA, N.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, n. 2013, p. 305–312, 2013.
- NDAGIJIMANA, P.; LIU, X.; YU, G.; WANG, Y. Synthesis of a novel core-shell-structure activated carbon material and its application in sulfamethoxazole adsorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, p. 602–612, 2019.
- NIE, X. P.; LIU, B. Y.; YU, H. J.; LIU, W. Q.; YANG, Y. F. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environmental Pollution**, v. 172, p. 23–32, 2013.

NIE, X.; WANG, X.; CHEN, J.; ZITKO, V.; AN, T. Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin - Nie - 2009 - Environmental Toxicology and Chemistry - Wiley Online Library. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 168–173, 2008.

OKADA, D. Y. **Degradação de surfactante aniônico em reator uasb com água residuária de lavanderia**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., 2012.

OLIVEIRA, C. A.; PENTEADO, E. D.; TOMITA, I. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; ZAIAT, M.; SILVA, B. F. da; LIMA GOMES, P. C. F. Removal kinetics of sulfamethazine and its transformation products formed during treatment using a horizontal flow-anaerobic immobilized biomass bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 365, p. 34–43, 2019.

OLIVEIRA, G. H. D.; SANTOS-NETO, A. J.; ZAIAT, M. Evaluation of sulfamethazine sorption and biodegradation by anaerobic granular sludge using batch experiments. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 1, p. 115–124, 2016.

OLIVEIRA, G. H. D.; SANTOS-NETO, A. J.; ZAIAT, M. Removal of the veterinary antimicrobial sulfamethazine in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor subjected to step changes in the applied organic loading rate. **Journal of Environmental Management**, v. 204, p. 674–683, 2017.

PAN, L. jia; LI, J.; LI, C. xing; TANG, X. da; YU, G. wei; WANG, Y. Study of ciprofloxacin biodegradation by a *Thermus* sp. isolated from pharmaceutical sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p. 59–67, 2018.

PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 6, p. 526–538, 2008.

PATELL, G.; SPROTT, G. *Methanosaeta concilii* gen. nov. sp. nov. (“*Methanothrix concilii*”) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 79–82, 1990.

PATERAKIS, N.; CHIU, T. Y.; KOH, Y. K. K.; LESTER, J. N.; MCADAM, E. J.; SCRIMSHAW, M. D.; SOARES, A.; CARTMELL, E. The effectiveness of anaerobic digestion in removing estrogens and nonylphenol ethoxylates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199–200, p. 88–95, 2012.

PAUL, T.; MILLER, P. L.; STRATHMANN, T. J. Visible-light-mediated TiO₂ photocatalysis of fluoroquinolone antibacterial agents. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 13, p. 4720–4727, 2007.

PENG, J.; WANG, X.; YIN, F.; XU, G. Characterizing the removal routes of seven pharmaceuticals in the activated sludge process. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 2437–2445, 2019.

PHAN, H. V.; WICKHAM, R.; XIE, S.; MCDONALD, J. A.; KHAN, S. J.; NGO, H. H.; GUO, W.; NGHIEM, L. D. The fate of trace organic contaminants during anaerobic digestion of primary sludge: A pilot scale study. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 384–390, 2018.

POEHLEIN, A.; KRABBEN, P.; DÜRRE, P.; DANIEL, R. Complete Genome Sequence of the Solvent Producer *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* Strain DSM 14923. **Genome Announc**, v. 2, n. 5, p. 2–3, 2014.

POIRIER-LARABIE, S.; SEGURA, P. A.; GAGNON, C. Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. **Science of the Total Environment**, v. 557–558, p. 257–267, 2016.

POLESEL, F.; LEHNBERG, K.; DOTT, W.; TRAPP, S.; THOMAS, K. V.; PLÓSZ, B. G. Factors influencing sorption of ciprofloxacin onto activated sludge: Experimental assessment and modelling implications. **Chemosphere**, v. 119, p. 105–111, 2015.

PRABHASANKAR, V. P.; JOSHUA, D. I.; BALAKRISHNA, K.; SIDDIQUI, I. F.; TANIYASU, S.; YAMASHITA, N.; KANNAN, K. Removal rates of antibiotics in four sewage treatment plants in South India. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 8679–8685, 2016.

QIANG, Z.; ADAMS, C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2874–2890, 2004.

QIU, Y. L.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; GUO, R. B.; SEKIGUCHI, Y. *Lactivibrio alcoholicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, mesophilic, lactate-, alcohol-, carbohydrate- and amino-acid-degrading bacterium in the phylum Synergistetes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2137–2145, 2014.

QIU, Y. L.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y.; SEKIGUCHI, Y. *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2051–2058, 2008.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 3, p. 1072–1079, 2009.

RADJENOVIĆ, J.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. **Water Research**, v. 43, n. 3, p. 831–841, 2009.

REGUEIRA, A.; GONZÁLEZ-CABALEIRO, R.; OFİTERU, I. D.; RODRÍGUEZ, J.; LEMA, J. M. Electron bifurcation mechanism and homoacetogenesis explain products yields in mixed culture anaerobic fermentations. **Water Research**, v. 141, p. 349–356, 2018.

REYES-CONTRERAS, C.; MATAMOROS, V.; RUIZ, I.; SOTO, M.; BAYONA, J. M. Chemosphere Evaluation of PPCPs removal in a combined anaerobic digester-constructed wetland pilot plant treating urban wastewater. **Chemosphere**, v. 84, n. 9, p. 1200–1207, 2011.

RIBEIRO, R. **Recuperação da qualidade de águas contaminadas por gasolina usando reator anaeróbio de leito fixo**. 2005. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., 2005.

RICHARD, J.; BOERGER, A.; VOM EYSER, C.; BESTER, K.; TUEK, J. Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, n. 4–5, p. 506–514, 2014.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. **Water Pollution Control Federation**, 1986.

ROBINSON, A. A.; BELDEN, J. B.; LYDY, M. J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 423–430, 2005.

ROMBOUTS, J. L.; MOS, G.; WEISSBRODT, D. G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Diversity and metabolism of xylose and glucose fermenting microbial communities in sequencing batch or continuous culturing. **FEMS microbiology ecology**, v. 95, n. 2, 2019.

ROMEIRO, G. F.; OLIVEIRA, C. A.; TOMITA, I. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; ZAIAT, M.; LIMA GOMES, P. C. F. Evaluation of sulfamethazine removal kinetics using fixed structured bed bioreactor. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 3330, p. 1–9, 2017.

SAKAI, S.; EHARA, M.; TSENG, I. C.; YAMAGUCHI, T.; BRÄUER, S. L.; CADILLO-QUIROZ, H.; ZINDER, S. H.; IMACHI, H. *Methanolinea mesophila* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil, and proposal of the archaeal family Methanoregulaceae fam. nov. within the order Methanomicrobiales. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1389–1395, 2012.

SAMARAS, V. G.; STASINAKIS, A. S.; MAMAS, D.; THOMAIDIS, N. S.; LEKKAS, T. D. Fate of selected pharmaceuticals and synthetic endocrine disrupting compounds during wastewater treatment and sludge anaerobic digestion. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 259–267, 2013.

SAMARAS, V. G.; STASINAKIS, A. S.; THOMAIDIS, N. S.; MAMAIS, D.; LEKKAS, T. D. Bioresource Technology Fate of selected emerging micropollutants during mesophilic , thermophilic and temperature co-phased anaerobic digestion of sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 365–372, 2014.

SAMUEL, B. S.; HANSEN, E. E.; MANCHESTER, J. K.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; FULTON, R.; LATREILLE, P.; KIM, K.; WILSON, R. K.; GORDON, J. I. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10643–10648, 2007.

SANTOS, C. E. D.; MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). **Journal of Environmental Management**, v. 166, p. 519–524, 2016.

SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; CALLEJÓN, M.; ALONSO, E. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 1509–1516, 2009.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 45–95, 2010.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725–759, 2006.

SCHÖCKE, L.; SCHINK, B. Energetics of methanogenic benzoate degradation by *Syntrophus gentianae* in syntrophic coculture. **Microbiology**, v. 143, n. 7, p. 2345–2351, 1997.

SEMBLANTE, G. U.; HAI, F. I.; HUANG, X.; BALL, A. S.; PRICE, W. E.; NGHIEM, L. D. Trace organic contaminants in biosolids: Impact of conventional wastewater and sludge processing technologies and emerging alternatives. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 1–17, 2015.

SHLIMON, A. G.; FRIEDRICH, M. W.; NIEMANN, H.; RAMSING, N. B.; FINSTER, K. *Methanobacterium aarhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 759–763, 2004.

SIEGRIST, H.; JOSS, A.; ALDER, A.; MCARDELL-BÜRGISSE, C.; GÖBEL, A.; KELLER, E.; TERNES, T. Micropollutants – New Challenge in Wastewater Disposal ? **Eawag News [engl. ed.]**, v. 57, p. 7–10, 2003.

SILVA, A. J.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93–98, 2006.

SILVA, F.; SERAFIM, L.; NADAIS, H.; ARROJA, L.; CAPELA, I. Acidogenic Fermentation Towards Valorisation of Organic Waste Streams into Volatile Fatty Acids. **Chem Biochem Eng Q**, v. 27, n. 4, p. 467–476, 2013.

SIPMA, J.; OSUNA, B.; COLLADO, N.; MONCLÚS, H.; FERRERO, G.; COMAS, J.; RODRIGUEZ-RODA, I. Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. **Desalination**, v. 250, n. 2, p. 653–659, 2010.

STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z.; KLEEREBEZEM, R.; PLUGGE, C. M. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 2, p. 352–362, 2012.

STASINAKIS, A. S.; KORDOUTIS, C. I.; TSIUOMA, V. C.; GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N. S. Removal of selected endocrine disrupters in activated sludge systems: Effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2090–2095, 2010.

STEVENS-GARMON, J.; DREWES, J. E.; KHAN, S. J.; MCDONALD, J. A.; DICKENSON, E. R. V. Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids. **Water Research**, v. 45, n. 11, p. 3417–3426, 2011.

STRIXINO, G.; STRIXINO, S. T. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticarloi* (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, n. 4, p. 177–180, 1985.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; ROLF-DIETER, W.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135–141, 1999.

SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 4, p. 1780–1786, 2009.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. **Water Research**, v. 44, n. 10, p. 3214–3224, 2010.

SVETLANA, K.; MACARIO, A. J. L.; KARSTEN, P. *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. **International journal of systematic bacteriology**, v. 48, n. 1 1998, p. 357–367, 1998.

TADKAEW, N.; HAI, F. I.; MCDONALD, J. A.; KHAN, S. J.; NGHIEM, L. D. Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. **Water Research**, v. 45, n. 8, p. 2439–2451, 2011.

TAMBOSI, J. L. **Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento**. 2008. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

TEMUDO, M. F.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. Influence of the pH on (Open) Mixed Culture Fermentation of Glucose: A Chemostat Study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 69–79, 2007.

TER LAAK, T. L.; DURJAVA, M.; STRUIJS, J.; HERMENS, J. L. M. Solid Phase Dosing and Sampling Technique To Determine Partition Coefficients of Hydrophobic Chemicals in Complex Matrixes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 10, p. 3736–3742, 2005.

TERNES, T. A.; HERRMANN, N.; BONERZ, M.; KNACKER, T.; SIEGRIST, H.; JOSS, A. A rapid method to measure the solid – water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. **Water Research**, v. 38, p. 4075–4084, 2004.

THABET, O. B. D.; FARDEAU, M. L.; JOULIAN, C.; THOMAS, P.; HAMDI, M.; GARCIA, J. L.; OLLIVIER, B. *Clostridium tunisiense* sp. nov., a new proteolytic, sulfur-reducing bacterium isolated from an olive mill wastewater contaminated by phosphogypse. **Anaerobe**, v. 10, n. 3, p. 185–190, 2004.

TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (uasb) de bancada no tratamento de esgoto lab-made simulando esgotos sanitários**. 1992. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., 1992.

TRAN, N. H.; REINHARD, M.; GIN, K. Y. H. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. **Water Research**, v. 133, p. 182–207, 2018.

VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; VAZOLLER, R. F.; FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 534–538, 1997.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. Al; ZAMBELLO, E. Science of the Total Environment Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater : Removal , mass load and environmental risk after a secondary treatment — A review. **Science of the Total Environment**, The, v. 429, p. 123–155, 2012.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R. S.; JEGATHEESAN, V. **Treatment of micropollutants in water and wastewater**. Londres: IWA Publishing, 2010.

VIVEIROS, W. **Chironomus sancticaroli – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, SP, 2012.

WALLRABENSTEIN, C.; HAUSCHILD, E.; SCHINK, B. Syntrophobacter pfennigii sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 5, p. 346–352, 1995.

WECKX, L. Antibiotics: from use to abuse. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 78, n. 2, p. 2–2, 2012.

WEXLER, H. M. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 593–621, 2007.

WIJEKOON, K. C.; MCDONALD, J. A.; KHAN, S. J.; HAI, F. I.; PRICE, W. E.; NGHIEM, L. D. Development of a predictive framework to assess the removal of trace organic chemicals by anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 391–398, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva (Switzerland): World Health Organization, 2014.

WU, M.; QUE, C.; TANG, L.; XU, H.; XIANG, J.; WANG, J.; SHI, W.; XU, G. Distribution, fate, and risk assessment of antibiotics in five wastewater treatment plants in Shanghai, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18055–18063, 2016.

XIAO, Y.; CHANG, H.; JIA, A.; HU, J. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1214, n. 1–2, p. 100–108, 2008.

XU, W.; ZHANG, G.; LI, X.; ZOU, S.; LI, P.; HU, Z.; LI, J. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. **Water Research**, v. 41, p. 4526–4534, 2007.

XUE, W.; WU, C.; XIAO, K.; HUANG, X.; ZHOU, H.; TSUNO, H.; TANAKA, H. Elimination and fate of selected micro-organic pollutants in a full-scale anaerobic/anoxic/aerobic process combined with membrane bioreactor for municipal wastewater reclamation. **Water Research**, v. 44, n. 20, p. 5999–6010, 2010.

YANG, G.; ZHANG, P.; ZHANG, G.; WANG, Y.; YANG, A. Degradation properties of protein and carbohydrate during sludge anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 126–130, 2015.

YANG, S.; HAI, F. I.; PRICE, W. E.; MCDONALD, J.; KHAN, S. J.; NGHIEM, L. D. Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 153–159, 2016.

YANG, S.; MCDONALD, J.; HAI, F. I.; PRICE, W. E.; KHAN, S. J.; NGHIEM, L. D. Effects of thermal pre-treatment and recuperative thickening on the fate of trace organic contaminants during anaerobic digestion of sewage sludge. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 124, p. 146–154, 2017.

YUAN, Q. Bin; GUO, M. T.; YANG, J. The sludge loading rate regulates the growth and release of heterotrophic bacteria resistant to six types of antibiotics in wastewater activated sludge. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, v. 17, n. 1, p. 206–212, 2015.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A. .; FORESTI, E. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo Para Tratamento de Águas Residuárias: Concepção e Avaliação Preliminar de Desempenho. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 11, n. 2, p. 33–42, 1994.

ZAVARZINA, D. G.; ZHILINA, T. N.; TOUROVA, T. P.; KUZNETSOV, B. B.; KOSTRIKINA, N. A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. *Thermanaerovibrio velox* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, organotrophic bacterium that reduces elemental sulfur, and emended description of the genus *Thermanaerovibrio*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1287–1295, 2000.

ZHANG, X.; ZHAO, H.; DU, J.; QU, Y.; SHEN, C.; TAN, F.; CHEN, J.; QUAN, X. Occurrence, removal, and risk assessment of antibiotics in 12 wastewater treatment plants from Dalian, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16478–16487, 2017.

ZHOU, H.; ZHANG, Z.; WANG, M.; HU, T.; WANG, Z. Enhancement with physicochemical and biological treatments in the removal of pharmaceutically active compounds during sewage sludge anaerobic digestion processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 361–369, 2017.

ZHOU, L. J.; YING, G. G.; LIU, S.; ZHAO, J. L.; YANG, B.; CHEN, Z. F.; LAI, H. J. Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China. **Science of the Total Environment**, v. 452–453, p. 365–376, 2013.

ZHU, J.; LIU, X.; DONG, X. *Methanobacterium movens* sp. nov. and *methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 2974–2978, 2011.

ZINDER, S. H.; ANGUISH, T.; LOBO, A. L. Isolation and characterization of a thermophilic acetotrophic strain of *Methanotherix*. **Archives of Microbiology**, v. 146, p. 315–322, 1987.

ZINDER, S. H.; CARDWELL, S. C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic ad, *methanotherix* sp as an important aceticlastic methanogen. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 4, p. 796–807, 1984.

ZORITA, S.; MÅRTENSSON, L.; MATHIASSEN, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 8, p. 2760–2770, 2009.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; MELIS, M.; FANELLI, R. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 1042–1048, 2010.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; REITANO, G.; BAGNATI, R.; CHIABRANDO, C.; POMATI, F.; ROSSETTI, C.; CALAMARI, D. Pharmaceuticals in the Environment in Italy : Causes , Occurrence , Effects and Control. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 13, n. 1, p. 15–21, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Perfis espaciais dos produtos de degradação monitorados no RALFE baseados em estudos prévios da literatura

Figura A1 - Produtos de degradação (PD) de SMX identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 239 (a e b), m/z 288 (c e d) e m/z 296 (e e f). C/C_0 corresponde a razão de concentração de SMX com relação a concentração inicial. $A/A_{máx}$ corresponde a razão de área dos cromatogramas dos PD apresentados na Figura B2 referente a área máxima obtida

Fonte: Autoria própria.

Figura A2 - Produtos de degradação (PD) de CIP identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 190 (a e b), m/z 223 (c e d) e m/z 263 (e e f). C/C_0 corresponde a razão de concentração de CIP com relação a concentração inicial. $A/A_{máx}$ corresponde a razão de área dos cromatogramas dos PD apresentados na Figura B4 referente a área máxima obtida

Fonte: Autoria própria.

Figura A3 - Produtos de degradação (PD) de CIP identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 306 (a e b), m/z 348 (c e d) e m/z 360 (e e f). C/C_0 corresponde a razão de concentração de CIP com relação a concentração inicial. $A/A_{máx}$ corresponde a razão de área dos cromatogramas dos PD apresentados na Figura B5 referente a área máxima obtida

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE B: Perfis espaciais das áreas cromatográficas dos produtos de degradação monitorados no RALFE

Figura B1 - Cromatogramas de íon extraído no modo SRM referente aos produtos de degradação (PD) de SMX identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 256 (a e b), m/z 270 (c e d) e m/z 254 (e e f).

Fonte: Autoria própria.

Figura B2 - Cromatogramas de íon extraído no modo SRM referente aos prutos de degradação (PD) de SMX identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 239 (a e b), m/z 288 (c e d) e m/z 296 (e e f).

Fonte: Autoria própria.

Figura B3 - Cromatogramas de íon extraído no modo SRM referente aos prontos de degradação (PD) de CIP identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 161 (a e b), m/z 276 (c e d) e m/z 316 (e e f).

Fonte: Autoria própria.

Figura B4 - Cromatogramas de íon extraído no modo SRM referente aos prutos de degradação (PD) de CIP identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 190 (a e b), m/z 223 (c e d) e m/z 263 (e e f).

Fonte: Autoria própria.

Figura B5 - Cromatogramas de íon extraído no modo SRM referente aos prontos de degradação (PD) de CIP identificados ao longo do perfil espacial do RALFE operado com esgoto lab-made durante a Fase VI (TDH = 4 h) e com esgoto doméstico durante a Fase VII (TDH = 12 h) – m/z 306 (a e b), m/z 348 (c e d) e m/z 360 (e e f).

Fonte: Autoria própria.