Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos

Sami Chatila

Biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino em reator
anaeróbio horizontal de leito fixo

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2013

Sami Chatila

Biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino em reator
anaeróbio horizontal de leito fixo

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

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

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **SAMI CHALITA**.

Título da dissertação: "Biodegradação de sulfametoxazola e ciprofloxacina em reator anaeróbio horizontal de leito fixo".

Data da defesa: 22/11/2013

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Marcelo Zaiat (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

aprovado

Prof. Dr. **Álvaro José dos Santos Neto**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

APROVADO

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

EESCUSP
Serviço de Pós-Graduação
Protocolado em 11/12/2013
11/12/2013

Aos meus pais, Dina e Abdul Sattar,
pela educação, que eles me ofereceram
e pelos anos de amor e comida e paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat, pela orientação, por todo o apoio e a contribuição ao meu conhecimento e pela paciência em todos os momentos. Obrigado pela confiança persistente, Professor. Também agradeço por ser um exemplo de como deveria ser um cientista, professor, e humano.

Ao Prof. Dr. Álvaro dos Santos Neto, pela co-orientação, pela paciência para explicar vários conceitos muitas vezes, e pela lembrança da paixão para a ciência.

A Roberto Medeiros e Rose Marie Maasri por abrir essa oportunidade de estudar no Brasil. Obrigado pela confiança. Obrigado por trazer o CNPq ao Líbano só porque eu quis estudar no Brasil. Está sendo uma experiência incrível e construtora.

Ao Prof. Dr. Eugênio Foresti, pelas conversas, histórias, e piadas, que sempre me deixavam com mais conhecimento e risada.

A Paulo Clairmont e Guilherme Oliveira, que além de sermos o “grupo de antibióticos”, me apoiaram a todo passo. Fizeram muitos sacrifícios e sempre serei grato.

Ao Lucas e à Maura, que além de serem a minha ligação com a parte analítica do projeto, foram a minha ligação à minha infância científica. Me ajudaram a não esquecer que sou químico.

À Inês, por sacrificar tempo de seu trabalho para me ajudar a completar o projeto.

Ao Gustavo, por ser um sonhador que tem os pés firmemente no chão e a cabeça na estratosfera. Obrigado pela inspiração e pelos cafés estendidos e conversas filosóficas.

Ao Rafael Brito, pela presença e disponibilidade constante para ajudar nas detalhes.

Ao Moacir que além de fazer todos lembrarem que cientista não sabe realmente como construir algo, sempre se disponibilizou como referência mas do que feliz para oferecer informações.

A todos do LPB, por terem feito um ambiente onde o trabalho inclui amizades, piadas, sorrisos, e caronas.

À Universidade de São Paulo e a Escola de Engenharia de São Carlos pela oportunidade especial. Ganhei uma *alma mater* que sempre terei orgulho de representar.

Ao CNPq pela oportunidade e pela confiança. Agradeço pela bolsa PEC-PG.

Ao meu país, Líbano, que me incentivou a procurar conhecimento em outros lugares do mundo.

Ao Brasil, por me chamar do outro lado do mundo com as suas culturas fascinantes e futuro brilhante.

A todos que não mencionei por nome, se eu vi você nos últimos anos, lhe devo agradecimento. Obrigado pela ajuda, apoio, amizade, e exemplo.

Resumo

CHATILA, S. (2013) *Biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino em reator anaeróbio horizontal de leito fixo*. 42 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

O presente trabalho aborda a biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino em 2 reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF). Os reatores foram operados e mantidos em regime permanente com um tempo de detenção hidráulica de 16 a 17 horas com uma água residuária sintética que simula o esgoto sanitário na temperatura de 25°C. Foi avaliado o estado dos reatores como ponto de referência para os próximos passos. A contaminação com sulfametoxazol e ciprofloxacino iniciou-se, então, e o comportamento dos reatores foi avaliado. As concentrações dos antimicrobianos foram analisadas por extração em fase sólida acoplada com espectrometria de massa. Ambos antimicrobianos foram degradados pelos reatores até níveis abaixo do limite de quantificação dos métodos de análise. Utilizando os dados de DQO e as análises dos antimicrobianos, junto com dados cinéticos obtidos, foi determinado que o RAHLF tem resistência a estes compostos e concentrações até uma ordem de magnitude acima das encontradas em condições reais. A degradação do sulfametoxazol foi muito eficiente e é previsto que um RAHLF típico em operação consegue degradar mais que 99% do sulfametoxazol. A degradação do ciprofloxacino foi menos eficiente, com remoção prevista para RAHLF típico de 80% a 90%.

Palavras-chave: *sulfametoxazol; ciprofloxacino; biodegradação anaeróbia; RAHLF; constantes cinéticas; esgoto sintético*

Abstract

CHATILA, S. (2013) Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin Biodegradation in a Horizontal Anaerobic Immobilized Sludge Reactor. 42 p. Master's Thesis – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The present project approaches sulfamethoxazole and ciprofloxacin biodegradation in two horizontal anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactors. The reactors were operated and maintained at dynamic stability with a hydraulic retention time of 16 to 17 hours using synthetic wastewater, which simulates domestic wastewater, at 25°C. The dynamically stable state was evaluated as a control for the following steps. The reactors were then continuously fed with synthetic wastewater contaminated with sulfamethoxazole and ciprofloxacin, independently, and their behaviors were observed. The antibiotics' concentrations were analyzed by solid phase extraction coupled with mass spectrometry. Both antibiotics were degraded in the bioreactors to below quantification limits. Using COD and antibiotic data and derived kinetic constants, it was shown that a typical operating HAIS reactor with a hydraulic retention time of 6 to 8 hours should be capable of removing over 99% of sulfamethoxazole in its influent. Ciprofloxacin removal was less efficient, but was nevertheless promising, with a removal rate of 80% to 90% in typical conditions.

Keywords: *sulfamethoxazole; ciprofloxacin; anaerobic biodegradation; HAIS reactor; kinetic constants; synthetic sewage*

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição do Efluente Sintético	27
Tabela 2: Composição da solução de sais	27
Tabela 3. Parâmetros Monitorados	30
Tabela 4. Valores médios de DQO – Reator 1	35
Tabela 5. Consumo de DQO no reator 1 sem contaminação	35
Tabela 6. Valores médio de DQO – Reator 2	38
Tabela 7. Consumo de DQO no reator 2 sem contaminação	38
Tabela 8 Concentrações de sulfametoxazol aplicadas no reator 1	40
Tabela 9 Consumo de DQO no reator 1 na Fase 1	40
Tabela 10 Consumo de DQO no reator 1 na Fase 2	41
Tabela 11 Consumo de DQO no reator 1 na Fase 3	42
Tabela 12 Consumo de sulfametoxazol (SMX) no reator 1 na Fase 1	43
Tabela 13 Consumo de sulfametoxazol (SMX) no reator 1 na Fase 2	44
Tabela 14 Consumo de sulfametoxazol (SMX) no reator 1 na Fase 3	45
Tabela 15 Consumo de DQO no reator 2 sob efeito de ciprofloxacino	47
Tabela 16 Consumo de ciprofloxacino (cipro) no reator 2	48
Tabela 17 $K_{app, DQO}$ para o reator 1	49
Tabela 18 $K_{app, SMX}$ nas três fases do trabalho	50
Tabela 19 $\theta_{h, min}$ para remoção de sulfametoxazol a eficiências variáveis	52
Tabela 20 $\theta_{h, min}$ para a remoção de 1,95 µg/L de sulfametoxazol com várias eficiências	53
Tabela 21 $K_{app, DQO}$ no reator 2 com e sem ciprofloxacino	54
Tabela 22 θ_h para remoção de ciprofloxacino em várias eficiências	55

Lista de Figuras

Figura 1 Grupo sulfonil	21
Figura 2 Sulfametoxazol	22
Figura 3 Ciprofloxacino	23
Figura 4 Esquema dos Reatores	27
Figura 5 DQO reator 1 sem contaminação com antibiótico	34
Figura 6 Remoção de DQO no Reator 1 sem contaminação com antibiótico	34
Figura 7 Consumo de DQO no reator 1 sem contaminação com sulfametoxazol	36
Figura 8 DQO reator 2 sem contaminação com antibiótico	37
Figura 9 Remoção de DQO no reator 2 sem contaminação com antibiótico	37
Figura 10 Consumo de DQO no reator 2 sem contaminação com ciprofloxacino	39
Figura 11 Consumo de DQO com 1,95 µg/L sulfametoxazol	41
Figura 12 Consumo de DQO com 23,2 µg/L sulfametoxazol	42
Figura 13 Consumo de DQO com 41, 3 µg/L sulfametoxazol	43
Figura 14 Consumo de 1,95 µg/L sulfametoxazol	44
Figura 15 Consumo de 23,2 µg/L sulfametoxazol	45
Figura 16 Consumo de 41,3 µg/L sulfametoxazol	46
Figura 17 Consumo de DQO com 4,52 µg/L ciprofloxacino	47
Figura 18 Consumo de 4,52 µg/L ciprofloxacino	48
Figura 19 Efeito do sulfametoxazol no funcionamento do reator 1	50
Figura 20 Relação entre C_{SMX} e $K_{app, SMX}$	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

ETA	estação de tratamento de água
ETE	estação de tratamento de esgoto
USP	Universidade de São Paulo
RAHLF	reator anaeróbio horizontal de leito fixo
UASB	upflow anaerobic sludge blanket
SPE	solid phase extraction
QqTOF	quadropole time-of-flight mass spectrometry
QqQMS	triple quadropole mass spectrometry
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
DQO	demanda química de oxigênio
TDH	tempo de detenção hidráulica
SMX	sulfametoxazol
Cipro	ciprofloxacino

Lista de Símbolos

L	comprimento
D	diâmetro
θ_h	tempo de detenção hidráulica
C	concentração
C_0	concentração inicial
K_{app}	constante cinética aparente

Sumário

Resumo.....	8
Abstract	9
Lista de Tabelas	10
Lista de Figuras.....	11
Lista de Abreviaturas e Siglas	12
Lista de Símbolos.....	13
Sumário	14
1 Introdução	16
2 Objetivo	19
3 Revisão Bibliográfica	20
3.1 Digestão Anaeróbia, e Metanogênese	20
3.2 Os Antibióticos: Sulfonamidas & Fluoroquinolonas	20
3.2.1 Sulfonamidas.....	20
3.2.2 Fluoroquinolonas	22
3.3 Biorreator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF)	23
3.4 Extração em fase sólida acoplada com espectrometria de massa	24
4 Material e Métodos.....	26
4.1 Instalação Experimental.....	26
4.2 Inoculação	27

4.3 Efluente Sintético	27
4.4 Operação dos Reatores	29
5 Resultados e Discussão	30
5.1 Operação em Regime Permanente sem Adição de Antibiótico	33
5.1.1 Reator 1	34
5.1.2 Reator 2	36
5.2 Contaminação com antimicrobianos	39
5.2.1 Reator 1 – Sulfametoxazol	40
5.2.2 Reator 2 - Ciprofloxacino	46
5.3 Estimativa da constante cinética aparente (K_{app}) e Tempo de retenção mínimo ($\theta_{h, min}$)	49
5.3.1 Reator 1 – Sulfametoxazol	49
5.3.2 Reator 2 – Ciprofloxacino	53
6 Conclusões.....	55
Referências.....	57

1 Introdução

Como é bem estabelecida hoje em dia, uma grande parte da poluição aquática, se não completamente, tem raízes no comportamento humano, e daí, cabe aos próprios Seres Humanos a responsabilidade de reverter o problema, ou, pelo menos, prevenir o agravamento da situação atual.

Resíduos domésticos, produtos químicos domésticos, fertilizantes, resíduos sólidos e subprodutos industriais são os poluentes da água mais relevantes. Consequentemente, os impactos desses poluentes no ambiente já são bem entendidos e a comunidade científica já se esforça para diminuir o efeito que eles causam no meio. Ademais, existem muitas pesquisas em andamento para melhorar os processos e os sistemas de tratamento dos resíduos antes do lançamento.

Vários produtos farmacêuticos em água e esgoto são uma fonte de preocupação porque eles são usados e liberados em grandes quantidades e suas propriedades físicas e químicas contribuem para a sua ampla distribuição no ambiente. A presença de pequenas concentrações desses poluentes emergentes tem sido associada à toxicidade crônica aos vários organismos que são expostos aos compostos, inclusive humanos. Ademais, essa forma de poluente representa uma parte crescente dos micropoluentes orgânicos traços encontrados em águas residuais domésticas que atingem as estações de tratamento de esgoto (ETE), metabolizados ou não. Muitas destas substâncias passam pelos sistemas de tratamento de esgoto e atingem recursos aquáticos superficiais.

A questão na remoção destes produtos farmacêuticos é que os produtos são principalmente compostos orgânicos sintéticos que até os sistemas de tratamento com

crescimento microbiano em biofilme, que são os mais versáteis, não conseguem decompô-los de forma eficiente. Os organismos responsáveis pela degradação biológica dos resíduos não possuem a combinação certa de ferramentas bioquímicas, tais como enzimas e proteínas estruturais, para conseguir remover muitos destes compostos, e muitas vezes são prejudicados pelos próprios compostos, como antibióticos.

Quando antibióticos são ingeridos por animais, a maior parte da dose administrada é despejada nos esgotos de uma forma quimicamente pouco alterada e biologicamente ativa (GALÁN, DÍAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2008). Como o tratamento dos esgotos é cada vez mais baseado em processos biológicos, sejam aeróbios ou anaeróbios, a presença de antibióticos ativos nos esgotos pode afetar a atividade das Estações de Tratamento de Esgotos (ETE), mesmo quando estiverem em baixas concentrações. A população microbiana presente nas ETE consegue metabolizar parcialmente os antibióticos e vários metabolitos saem com o efluente para os corpos de água. Além disso, os antibióticos podem afetar a biomassa, o que poderá resultar em uma atividade biológica inibida ou diminuída até as várias comunidades microbianas se adaptarem e adquirirem a resistência necessária.

O entendimento da cinética da degradação de antibióticos por comunidades microbianas em biorreatores aplicados ao tratamento de águas residuárias é crucial para se avaliar os efeitos desses compostos sobre o desempenho desses biorreatores. Além disso, esse conhecimento é importante para a avaliação dos metabólitos lançados no ambiente como consequência da biodegradação parcial desses compostos. A importância da questão da biodegradação de antibióticos por microrganismos já é estabelecida, porém poucos trabalhos já produziram dados cinéticos sobre a degradação de antibióticos em biorreatores.

Esse projeto está congregando esforços do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos-USP, na área de biorreatores anaeróbios, com pesquisadores do Laboratório de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos-USP, para avaliação da biodegradação de dois antibióticos: sulfametoxazol e ciprofloxacino. Para esse trabalho inicial, foi escolhido o reator anaeróbio horizontal de leito fixo, desenvolvido na Escola de Engenharia de São Carlos como um reator com escoamento próximo ao pistonado, que permite a estratificação da atividade microbiana ao longo do comprimento, resultando em ambientes mais definidos e submetidos a substratos mais específicos. A característica hidrodinâmica desse reator leva a duas consequências muito importantes:

1. A estratificação e especialização da biomassa contribuem para uma maior capacidade de digestão de compostos mais complexos.
2. O escoamento pistonado permite se observar as transformações ao longo do comprimento do reator, facilitando a identificação e quantificação de compostos intermediários gerados e, consequentemente, facilitando a definição da biodegradação do composto original.

Esses dois pontos foram utilizadas para o estudo da biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino, principalmente para determinação constantes cinéticos aparentes da sua degradação.

2 Objetivo

O objetivo principal dessa pesquisa foi a determinação de um modelo cinético e a estimativa dos parâmetros da biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino em comunidades microbianas anaeróbias metanogênicas usando um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF).

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Digestão Anaeróbia e Metanogênese

Digestão anaeróbia é uma série de processos em que microrganismos decompõem material biodegradável na ausência de oxigênio, utilizados para fins industriais ou domésticos para o tratamento de resíduos e a liberação de energia. O processo de digestão começa com a hidrólise bacteriana dos materiais de entrada, para quebrar os polímeros orgânicos insolúveis, tais como carboidratos, e torná-los disponíveis para outras bactérias. Bactérias acidogênicas continuam a converter os açúcares e aminoácidos em dióxido de carbono (CO_2), hidrogênio (H_2), amônia (NH_3), e ácidos orgânicos. Bactérias acetogênicas convertem esses ácidos orgânicos em ácido acético (CH_3COOH), junto com NH_3 , H_2 e CO_2 . Finalmente, arqueias metanogênicas convertem esses produtos para metano (CH_4) e CO_2 (MARCHAIM, 1992).

3.2 Os Antibióticos: Sulfonamidas e Fluoroquinolonas

Sulfonamidas e fluoroquinolonas são duas classes de químicos sintéticos que, em várias formas, demonstram alta atividade antimicrobiana. Sendo sintéticos, a maioria dos organismos encontram muitas dificuldades em metabolizá-las. Porém, várias comunidades bacterianas adquirem a capacidade de desativar estes compostos xenobióticos e consequentemente, adquirem resistência contra a ação deles, mesmo não conseguindo a degradação completa.

3.2.1 Sulfonamidas

Sulfonamidas foram os primeiros fármacos antibacterianos aplicados com sucesso em doenças infecciosas humanas. Eles são prescritos para o tratamento de infecções do trato urinário, infecções de ouvido, bronquite, meningite bacteriana, algumas infecções nos olhos,

pneumonia por *Pneumocystis carinii*, entre outros. No entanto, quantidades mais relevantes estão agora sendo utilizadas em medicina veterinária para tratar rebanhos de gado (GALÁN, DÍAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2008).

O grupo funcional de sulfonamidas é o grupo sulfonil (Figura 1) condensado com uma amina. Esse sítio ativo interfere na produção bacteriana do ácido fólico e resulta na morte do microrganismo. O metabolismo de várias sulfonamidas tem sido estudado recentemente e foi demonstrado que, na maioria das vezes, os metabólitos biologicamente ativos das sulfonamidas estudados permanecem no efluente de estações de tratamento químico e biológico. Isso mostra que os processos convencionais não conseguem decompor este grupo funcional (GALÁN, VILLAGRASA, *et al.*, 2010). A sulfonamida escolhida para este trabalho foi o sulfametoxazol (Figura 2). A escolha foi baseada na significância e popularidade do antimicrobiano, além dos bons resultados do método analítico na detecção dessa sulfonamida.

Figura 1. Grupo sulfonil

Figura 2. Sulfametoxazol

3.2.2 Fluoroquinolonas

Fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos que já foram muito comuns no tratamento de infecções bacterianas em humanos, mas hoje são muito menos usados por causa de efeitos adversos e resistência difundida em muitos patógenos. Os usos mais comuns hoje são para algumas doenças respiratórias humanas, e muito mais comumente como antibiótico veterinário. A resistência bacteriana a esses antibióticos é baseada na prevenção da chegada do antibiótico na enzima por dois tipos de mutações. O primeiro tipo de mutação acarreta uma alteração nas enzimas alvo, enquanto o outro tipo de mutação altera os poros na parede celular. Essas duas vias de resistência não modificam o antibiótico porque o microrganismo pode desativar a toxicidade do composto sem produzir enzimas para a biodegradação (HOOPER, 2010).

Outros casos de biodegradação aeróbia de fluoroquinolonas por fungos são documentados (WETZSTEIN, SCHMEER e KARL, 1997), em que a rota bioquímica de biodegradação é indefinida.

Portanto, a biodegradação de fluoroquinolonas ainda deve ser explorada uma vez que esses compostos ainda são considerados não-biodegradáveis.

A fluoroquinolona escolhida para este trabalho foi o ciprofloxacino (Figura 3), pela sua significância ambiental e pela ótima detecção que o método analítico tem para esse composto.

Figura 3. Ciprofloxacino

3.3 Biorreator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo

O biorreator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) foi desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo como uma configuração alternativa e mais racional de sistemas que já existiam, como o UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), também denominado Reator de Manta de Lodo e Escoamento Ascendente. Nos dois reatores ocorrem o mesmo processo, e os aspectos diferenciais são a hidrodinâmica e a forma de aderência e fixação da biomassa. No UASB, o escoamento do afluente é vertical,

que garante uma mistura quase completa do afluente no momento de entrar em contato com o conteúdo do reator. Por isso, o reator possui um ambiente quase homogêneo e uma biomassa diversificada e uniforme ao longo do reator. O RAHLF possui um escoamento horizontal, que permite mistura quase exclusivamente na superfície perpendicular à direção de escoamento. A consequência disso é o movimento de unidades cilíndricas no sentido axial, e a resultante estratificação da atividade da biomassa nas várias regiões do reator. Essas são características que tornaram o reator mais eficiente na remoção de compostos tóxicos, pois o processo de desintoxicação é dividido em comunidades microbianas mais especializadas (ZAIAT, 2003). Isso já foi demonstrado ser viável na remoção de formaldeído (OLIVEIRA, *et al.*, 2004), sendo o RAHLF mais eficiente na remoção de desse composto que várias outras soluções, como lodo ativado, por exemplo.

3.4 Extração em fase sólida acoplada com cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa

Talvez a mais importante parte deste projeto, além do objetivo principal, seja a aplicação do novo método de análise a ser utilizado para a quantificação de micropoluentes e para futuros estudos dos metabolismos dos tóxicos. Este método tem várias vantagens devido ao limite de detecção baixo e à especificidade do procedimento. Os métodos de amostragem e análise tradicionais custam muito em termos de materiais, solventes e requerem grandes volumes de amostra. A tendência contemporânea nas áreas de pesquisa é de procurar novos métodos que diminuam o custo ambiental e financeiro das pesquisas e ao mesmo tempo, aumentem a precisão e frequência de medidas.

Os métodos de SPE-HPLC-QqTOF (Solid Phase Extraction – High Performance Liquid Chromatography – Quadropole Time-of-Flight Mass Spectrometry) e SPE-HPLC-QqQMS (Solid

Phase Extraction – High Performance Liquid Chromatography – Triple Quadrupole Mass Spectrometry) desenvolvidos por pesquisadores do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) são extrações em fases sólidas seguidas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, que dão resultados de alta precisão, detectando concentrações menores de 1 µg/L, em meios complexos, com baixo custo ambiental e operacional, pelo uso limitado de solventes e a possibilidade de quantificar a presença de vários compostos em uma única análise.

A utilização destes métodos analíticos facilitou a avaliação da biodegradação dos tóxicos deste projeto em condições mais realistas. A grande maioria de trabalhos anteriores publicados avaliam a presença de antimicrobianos em águas residuárias reais usando amostras de volumes de amostra de 1 L ou mais (RENEW e HUANG, 2004). Isso é viável na presença de volumes grandes disponíveis para amostragem, mas a aplicação destas técnicas em avaliação controlada e reatores de bancada não é viável. Outros trabalhos avaliaram a biodegradação de antimicrobianos e até tiram conclusões sobre a cinética de remoção biológica dos compostos usando métodos analíticos mais tradicionais. Porém, esses trabalhos avaliaram o comportamento de um sistema biológico em que o antimicrobiano é a única fonte de carbono ou nitrogênio (DRILLIA, DOKIANAKIS, *et al.*, 2005). Essa condição é simplesmente fora da realidade do problema de poluentes emergentes em geral e as conclusões do trabalho não correspondem a nenhuma realidade.

Ambas situações podem dar conhecimento inicial sobre o assunto de biodegradação de fármacos, mas ambas também deixam um espaço muito grande para o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de auxiliar trabalhos que visam entender os processos biológicos envolvidos na biodegradação de compostos tóxicos preocupantes. Juntando

esforços e conhecimentos de dois grupos de pesquisa, este trabalho abordou este espaço e foi o primeiro no caminho para maior conhecimento sobre as questões levantadas.

4 Material e Métodos

O projeto foi desenvolvido em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), contendo microrganismos imobilizados em suporte bioquimicamente inerte no tempo relevante ao experimento, com a finalidade da determinação dos modelos cinéticos que representam a biodegradação dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacino, com consequente estimativa dos parâmetros cinéticos. O emprego desse reator se justifica pelo comportamento hidrodinâmico muito próximo a um reator tubular ideal (plug-flow), o que leva a facilidade no equacionamento cinético e facilita a obtenção de dados cinéticos.

4.1 Instalação Experimental

Foram operados dois reatores horizontais anaeróbios de leito fixo, construídos de acrílico, de volume total de 2 L, com relação L/D de aproximadamente 20, com comprimento (L) de 100 cm e diâmetro (D) de 5 cm. Os reatores possuíam quatro amostradores espaçados 20 cm um do outro, conforme esquema apresentado na Figura 4. A temperatura de operação foi de 25 °C, mantida em uma câmara térmica, e ambos reatores foram operados com uma única bomba peristáltica Gilson Minipuls Evolution com cabeçote HF2. Os meios líquido foram colocados em uma geladeira comum, com tubulações de PVC para bombeamento.

Figura 4: Esquema dos Reatores (OLIVEIRA, MORAES, *et al.*, 2004)

4.2 Inoculação

Os reatores operados foram inoculados com biomassa obtida de reatores UASB usados para tratamento de águas residuárias de abate de aves. Essa biomassa foi batida no liquidificador por alguns segundos e misturada com o material suporte composto de cilindros de espuma de poliuretano de diâmetro de aproximadamente 10 mm e altura de aproximadamente 15 mm envoltos por cilindros de polipropileno. A biomassa foi deixada 6 horas em contato com o material suporte para a aderência dos microrganismos. Após esse procedimento, o material suporte foi colocado nos reatores, formando o leito empacotado.

4.3 Efluente Sintético

Nesse trabalho foi utilizado efluente sintético que contém a fonte de compostos orgânicos necessários para o crescimento microbiano, além dos micronutrientes requeridos. Este efluente simula um efluente doméstico, nos aspectos nutritivos. A composição segue o meio Torres apresentado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Composição do Efluente Sintético (TORRES, *et al.*, 1996)

Composto	Quantidade/L
Sacarose	35 mg
Amido	114 mg
Celulose	34 mg
Extrato de carne	208 mg
Óleo de soja	51 mg/0,05484mL
NaHCO₃	200 mg
Detergente	3 gotas
Solução de sais	4 mL

Tabela 2: Composição da solução de sais (TORRES, *et al.*, 1996)

Composto	Concentração (mg/L)
NaCl	250
MgCl₂·6H₂O	7
CaCl₂·2H₂O	4,5

Recipientes de polietileno de volume de 5 L foram utilizados para o preparo e armazenamento do efluente sintético. Os reatores foram sempre alimentados separadamente usando recipientes próprios. Inicialmente, foi preparado 1 L de solução de sais, com a composição descrita na Tabela 2, que foi utilizado ao longo da operação dos reatores. O próximo passo foi, a cada 2 a 3 dias, a pesagem das alíquotas de componentes sólidos da Tabela 1 (sacarose, amido, celulose, extrato de carne, bicarbonato de sódio), e juntar tudo em balão de Erlenmeyer. Esta mistura de sólidos foi solubilizada em água de torneira dentro dos balões de Erlenmeyer, enquanto os componentes líquidos do esgoto sintético (óleo de soja, detergente, solução de sais) foram medidos com micropipetas e depositados dentro dos recipientes. O conteúdo do balão de Erlenmeyer foi colocado dentro do recipiente e lavado 3 vezes com água de torneira para evitar perda de resíduos não

dissolvidos. Depois, o recipiente foi preenchido com água de torneira até a metade, agitado bem, e depois o volume foi completado até a marca de 5 L. Neste momento, o efluente sintético estava pronto para colocar na geladeira a 4 °C para a alimentação dos reatores.

4.4 Operação dos Reatores

Depois da introdução dos suportes com biomassa nos reatores, iniciou-se a alimentação com água de torneira com a vazão de operação de 1 mL/minuto durante 24 horas. Esta vazão foi definida baseado na consideração que o volume útil do reator em operação seria comparável ao volume de água no reator com o material suporte não completamente hidratado, que seria em torno de 1450 mL. Considerando que o meio líquido não ocupa toda a seção do reator, sobrando aproximadamente 1 cm para a zona de separação de biogás, e também considerando que o volume útil de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo corresponde a 60% do volume total disponível, a vazão (Q) de 1 mL/min correspondeu a um tempo de retenção hidráulica (θ_h) de 16.8 horas.

No segundo dia de operação, iniciou-se a alimentação com o esgoto sintético descrito anteriormente, sem a adição de antibióticos. Essa alimentação continuou fixa durante cinco meses até os métodos analíticos para a quantificação dos antibióticos chegaram a serem validados e para que o reator atingisse o regime permanente de operação em relação à degradação da matéria orgânica. Durante esse período e até o fim do projeto, foram feitas as análises apresentadas na Tabela 3. Assim, foi garantido o regime permanente e uma linha de base de desempenho dos reatores foi estabelecida. Enquanto isso, os métodos analíticos foram validados para os afluentes e os efluentes dos reatores. Os reatores foram caracterizados e analisados na condição de estabilidade dinâmica e amostras foram tiradas nos amostradores ao longo do reator e no efluente.

Neste ponto, foram preparadas duas soluções estoque de sulfametoxazol e ciprofloxacino de 5 mg/L em água ultrapura. Essas soluções serviriam como contaminante no afluente de cada reator. Na primeira fase de contaminação, o esgoto sintético começou a ser continuamente contaminado com 2 µg/L de sulfametoxazol no reator 1 e 2 µg/L de ciprofloxacino no reator 2. A partir desse momento, iniciou o monitoramento da concentração dos antibióticos no efluente dos reatores. Após três semanas, e quando a concentração da sulfametoxazol ficou constantemente abaixo do limite de quantificação do método de análise, perfis dos reatores foram elaborados. Amostras foram retiradas de cada amostrador dos reatores e analisada para DQO, ácidos voláteis totais, e o antibiótico. Após a ampliação do perfil metabólico, as concentrações dos antibióticos em cada reator foram aumentadas para 10 µg/L e depois para 20 µg/L e as mesmas análises foram executadas.

Tabela 3. Parâmetros Monitorados

Parâmetro	Frequência	Metodologia
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	3 vezes por semana	Standard Methods (APHA, 2005)
pH	3 vezes por semana	Standard Methods (APHA, 2005)
Sulfametoxazol	2 vezes por semana	SPE-QToF
Ciprofloxacino	2 vezes por semana	SPE-QqQMS

4.5 Análise de antibióticos

As análises dos antibióticos foram desenvolvidas pelo Lucas Sponton de Carvalho (sulfonamidas) e pela Maura Roquete Amparo (fluoroquinolonas), como projetos de mestrado no IQSC. O procedimento das análises seguiu a extração em fase sólida e

resuspensão em solvente, a separação por cromatografia líquida de alto desempenho, e a detecção por espectrometria de massa.

No caso de amostras com sulfametoxazol, dois cartuchos em série foram utilizados, o primeiro empacotado com fase estacionária de octadecilsilano e o segundo empacotado com polímeros mistos. Os cartuchos foram primeiro lavados com metanol, e posteriormente condicionados com água acidificada em pH 3,4 (com 0,1% ácido fórmico v/v) que garante que qualquer sulfonamida analisada encontra-se em estado neutro, não ionizado. Depois, 100 mL da amostra são acidificados em pH de 3,4 e passados pelo cartucho. Os cartuchos são lavados com 5 mL da água acidificada e secados sob baixa pressão e finalmente eluídos com uma solução de 5% ácido fosfórico em acetonitrila, que é coletada. Esta solução é secada com fluxo de N₂, e depois resuspensa em 500 µL de água para análise por cromatôgrafo líquido acoplado a espectrômetro de massa (MS-qTOF). O limite de quantificação deste método é 0,4 µg/L com coeficiente de correlação de 0,995.

Similarmente, o ciprofloxacino foi analisado utilizando dois cartuchos de extração em fase sólida, o primeiro empacotado de fase polimérica de troca iônica forte, e o segundo de fase polimérica reversa. Os cartuchos foram condicionados com 6 mL de metanol, seguidos por 6 mL de água Milli-Q e 6 mL de água acidificada com ácido fórmico em pH 3,0. Depois, 100 mL da amostra são acidificados em pH de 3,0 e percolados pelos cartuchos em série. Após uma lavagem com 3 mL de água acidificada, os cartuchos foram secados a vácuo por 20 min e depois eluídos com 6 mL de metanol, que foi coletado. Esta solução é secada com fluxo de N₂ e banho, e depois resuspensa em 500 µL de água com 0,1% ácido fórmico para análise por cromatôgrafo líquido acoplado a espectrômetro de massa (MS-qTOF). O limite de quantificação deste método é 15 ng/L com coeficiente de correlação de 0,9945.

5 Resultados e Discussão

Neste capítulo, são apresentados os resultados dos ensaios realizados. Inicialmente, são avaliados aspectos do funcionamento do reator alimentado com meio sintético, em regime permanente, sem adição de antibióticos. Em seguida, são abordados os dados de remoção de sulfametoxazol e ciprofloxacino, e a avaliação do efeito deles na remoção de matéria orgânica pelo sistema biológico inerente ao RAHLF.

A discussão dos resultados nesse trabalho se baseiam na análise dos perfis espaciais obtidos ao longo do RAHLF em regime permanente. Como já explicitado, O RAHLF foi escolhido por ter escoamento próximo ao pistonado, o que leva à possibilidade de estimativa dos parâmetros cinéticos de forma mais direta.

Dessa forma, para matéria orgânica (avaliada como DQO) e para os antibióticos estudados, foi feito balanço de massa em elemento diferencial do RAHLF com as seguintes considerações:

1. O reator apresenta escoamento pistonado.
2. O reator opera em condições isotérmicas.
3. O reator encontra-se em regime permanente.
4. O reator é considerado pseudo-homogêneo. Dessa forma, embora a biomassa esteja imobilizada, o balanço foi realizado como se o reator fosse homogêneo. Isso foi feito pelo fato das condições de transferência de massa não diferirem de um experimento para outro, tornando as constantes cinéticas obtidas comparáveis diretamente. No entanto, as constantes obtidas são aparentes e não intrínsecas,

por incluírem os fenômenos de transporte de massa, além dos cinéticos, em seu valor.

Além disso, pela observação dos perfis obtidos, foi considerado modelo cinético de primeira ordem para todas as situações e o balanço geral para matéria orgânica ou para um antibiótico específico resultou em:

$$C = C_0 e^{-K_{app}\theta_h} \quad (5.1)$$

Na equação 5.1, C_0 corresponde à concentração do substrato no afluente do reator, e K_{app} corresponde à constante cinética de primeira ordem aparente. K_{app} pode ser utilizado para uma avaliação preliminar do sistema deste projeto em regime permanente, e para fins exploratórios. É importante notar que o K_{app} é dependente do sistema em que foi adquirido e não representa estritamente uma rota bioquímica. Apesar disso, as conclusões obtidas poderão dar início a outros estudo mais aprofundados.

As próximas secções apresentarão os resultados obtidos em cada reator em cada condição avaliada, além da estimativa de K_{app} para cada situação. Para os ajustes foi usado software Origin® 9.0.

5.1 Operação em Regime Permanente sem Adição de Antibiótico

Os reatores neste projeto foram operados por um tempo prolongado para garantir a estabilidade da biomassa e os processos biológicos anaeróbios. Durante esse tempo de 6 meses de estabilização, ambos os reatores foram alimentados com o meio Torres, e o desempenho deles foi monitorado em termos de eficiência de remoção de DQO.

5.1.1 Reator 1

O desempenho do reator foi monitorado ao longo de cinco meses por meio de análises de remoção de matéria orgânica. A estabilidade dinâmica do sistema foi verificada por meio de análise de remoção de DQO apresentada nas Figuras 3 e 4.

Figura 5. DQO reator 1 sem contaminação com antibiótico

Figura 6. Remoção de DQO no Reator 1 sem contaminação com antibiótico

Considera-se que o reator entrou em regime permanente em cerca de dia 25. Os valores médios de DQO e de remoção são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios de DQO – Reator 1

Número de pontos	40
DQO – Afluente	249 ± 11 mg/L
DQO – Efluente	19 ± 1 mg/L
Remoção	91 ± 5 %

A Tabela 3 demonstra que a eficiência de remoção de DQO no reator 1 estava estável e em regime permanente antes da introdução da sulfametoxazol.

Os dados apresentados nesta secção representam o perfil o primeiro reator que foi posteriormente destinado para o tratamento da sulfametoxazol.

A Tabela 5 apresenta o perfil de consumo de DQO do reator 1 sem a aplicação de sulfametoxazol:

Tabela 5. Consumo de DQO no reator 1 sem contaminação

L/D	θ_h (h)	DQO (mg/L)
0	0,00	258,28
4	3,37	28,46
8	6,74	20,11
12	10,10	22,17
16	13,47	19,07
20	16,84	19,59

A Figura 5 apresenta dados de consumo de matéria orgânica pelo reator 1 em termos de θ_h .

Figura 7: Consumo de DQO no reator 1 sem contaminação com sulfametoxazol

5.1.2 Reator 2

O desempenho do reator foi monitorado ao longo de cinco meses por meio de análises de remoção de matéria orgânica. A estabilidade dinâmica do sistema foi verificada por meio de análise de remoção de DQO apresentada nas Figuras 6 e 7.

Figura 8. DQO reator 2 sem contaminação com antibiótico

Figura 9. Remoção de DQO no reator 2 sem contaminação com antibiótico

Considera-se que o reator entrou em regime permanente cerca de dia 20. Os valores médios de DQO e de remoção são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores médio de DQO – Reator 2

Número de pontos	40
DQO – Afluente	252 ± 11 mg/L
DQO – Efluente	47 ± 15 mg/L
Remoção	81 ± 5 %

A Tabela 5 demonstra que a eficiência de remoção de DQO no reator 2 estava estável e em regime permanente antes da introdução da ciprofloxacino.

Os próximos dados apresentados representam o perfil do segundo reator que foi posteriormente destinado para o tratamento da ciprofloxacino.

A Tabela 7 apresenta o perfil de consumo de DQO do reator 2 sem a aplicação de ciprofloxacino:

Tabela 7. Consumo de DQO no reator 2 sem contaminação

L/D	θ_h (h)	DQO (mg/L)
0	0,00	247,34
4	3,37	49,72
8	6,74	40,7
12	10,10	42,55
16	13,47	39,83
20	16,84	41,42

A Figura 8 apresenta dados de consumo de matéria orgânica pelo reator 2 em termos de θ_h .

Figura 10: Consumo de DQO no reator 2 sem contaminação com ciprofloxacino

5.2 Contaminação com antimicrobianos

Neste capítulo, serão descritos e apresentados os resultados da fase de contaminação dos reatores com antibiótico. Primeiramente serão apresentados os resultados do primeiro reator, que passou por uma contaminação com sulfametoxazol, e depois serão abordados os dados do segundo reator, contaminado com ciprofloxacino.

5.2.1 Reator 1 – Sulfametoxazol

Os dados apresentados nesta secção representam o comportamento do reator após a estabilização da remoção da sulfametoxazol. Os dados são do perfil metabólico adquirido por meio do procedimento descrito na secção 4.4.

A Tabela 8 apresenta as concentrações de sulfametoxazol reais aplicadas no reator um ao longo da fase experimental.

Tabela 8 Concentrações de sulfametoxazol aplicadas no reator 1

Fase	C _{sulfa} µg/L
1	1,95
2	23,2
3	43,3

A Tabela 9 apresenta o perfil de consumo de DQO do reator 1 com a contaminação do meio líquido com 1,95 µg/L sulfametoxazol:

Tabela 9 Consumo de DQO no reator 1 na Fase 1

L/D	θ _h (h)	DQO (mg/L)
0	0,00	265,27
4	3,37	29,49
8	6,74	21,07
12	10,10	19,87
16	13,47	20,62
20	16,84	19,64

A Figura 9 apresenta dados de consumo de matéria orgânica pelo reator 1 em termos de θ_h com a contaminação com 1,95 µg/L de sulfametoxazol.

Figura 11 Consumo de DQO com 1,95 µg/L sulfametoxazol

A Tabela 10 apresenta o perfil de consumo de DQO do reator 1 com a contaminação do meio líquido com 23,2 µg/L sulfametoxazol:

Tabela 10 Consumo de DQO no reator 1 na Fase 2

L/D	θ_h (h)	DQO (mg/L)
0	0,00	243,46
4	3,37	31,67
8	6,74	20,59
12	10,10	21,02
16	13,47	19,73
20	16,84	22,41

A Figura 10 apresenta dados de consumo de matéria orgânica pelo reator 1 em termos de θ_h com a contaminação com 23,2 µg/L de sulfametoxazol.

Figura 12 Consumo de DQO com 23,2 µg/L sulfametoxazol

A Tabela 11 apresenta o perfil de consumo de DQO do reator 1 com a contaminação do meio líquido com 41,3 µg/L sulfametoxazol:

Tabela 11 Consumo de DQO no reator 1 na Fase 3

L/D	θ_h (h)	DQO (mg/L)
0	0,00	254,73
4	3,37	30,17
8	6,74	22,53
12	10,10	20,16
16	13,47	21,35
20	16,84	20,17

A Figura 11 apresenta dados de consumo de matéria orgânica pelo reator 1 em termos de θ_h com a contaminação com 41,3 µg/L de sulfametoxazol.

Figura 13 Consumo de DQO com 41,3 µg/L sulfametoxazol

A Tabela 12 apresenta o perfil de consumo da sulfametoxazol do reator 1 com a contaminação do meio líquido com concentração inicial de 1,95 µg/L:

Tabela 12 Consumo de sulfametoxazol (SMX) no reator 1 na Fase 1

L/D	θ_h (h)	C_{SMX} (µg/L)
0	0,00	1.95
4	3,37	0.105
8	6,74	0.108
12	10,10	0.039
16	13,47	0.000

A Figura 12 apresenta dados de consumo de sulfametoxazol pelo reator 1 em termos de θ_h com a concentração no afluente de 1,95 µg/L:

Figura 14 Consumo de 1,95 µg/L sulfametoxazol

A Tabela 13 apresenta o perfil de consumo da sulfametoxazol do reator 1 com a contaminação do meio líquido com concentração inicial de 23,2 µg/L:

Tabela 13 Consumo de sulfametoxazol (SMX) no reator 1 na Fase 2

L/D	θ_h (h)	C_{SMX} (µg/L)
0	0,00	23,2
4	3,37	0,56
8	6,74	1,726
12	10,10	1,936
16	13,47	0,773
20	16,84	0,098

A Figura 13 apresenta dados de consumo de sulfametoxazol pelo reator 1 em termos de θ_h com a concentração no afluente de 23,2 µg/L:

Figura 15 Consumo de 23,2 µg/L sulfametoxazol

A Tabela 14 apresenta o perfil de consumo da sulfametoxazol do reator 1 com a contaminação do meio líquido com concentração inicial de 41,3 µg/L:

Tabela 14 Consumo de sulfametoxazol (SMX) no reator 1 na Fase 3

L/D	θ_h (h)	C_{SMX} (µg/L)
0	0,00	41,3
4	3,37	15,479
8	6,74	2,867
12	10,10	4,727
16	13,47	0,545
20	16,84	0

A Figura 14 apresenta dados de consumo de sulfametoxazol pelo reator 1 em termos de θ_h com a concentração no afluente de 41,3 µg/L:

Figura 16 Consumo de 41,3 µg/L sulfametoxazol

5.2.2 Reator 2 - Ciprofloxacino

Os dados apresentados nesta secção representam o comportamento do reator com a contaminação do meio líquido com ciprofloxacino. Os dados são do perfil metabólico adquirido por meio do procedimento descrito na secção 4.4.

Está fase do experimento foi executada com 3 concentrações nominais de 2 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L. Porém, por limitações de análise ou fatores experimentais desconhecidos, apresentou-se uma dificuldade na quantificação da concentração de ciprofloxacino em muitas amostras. Apenas uma das fases avaliadas teve resultados significativos, e serão apresentados nesta secção.

A Tabela 15 apresenta o perfil de consumo de DQO do reator 2 com a contaminação do meio líquido com 4,52 µg/L ciprofloxacino:

Tabela 15 Consumo de DQO no reator 2 sob efeito de ciprofloxacino

L/D	θ_h (h)	DQO (mg/L)
0	0,00	260,55
4	3,37	52,27
8	6,74	40,28
12	10,10	41,02
16	13,47	39,35
20	16,84	42,22

A Figura 15 apresenta dados de consumo de matéria orgânica pelo reator 2 em termos de θ_h com a contaminação com 4,52 µg/L de ciprofloxacino:

Figura 17 Consumo de DQO com 4,52 µg/L ciprofloxacino

A Tabela 16 apresenta o perfil de consumo da sulfametoxazol do reator 2 com a contaminação do meio líquido com concentração inicial de 4,52 µg/L:

Tabela 16 Consumo de ciprofloxacino (cipro) no reator 2

L/D	θ_h (h)	$C_{\text{cipro}}(\mu\text{g/L})$
0	0,00	4,52132
4	3,37	0,91694
8	6,74	1,84714
12	10,10	0,1954
16	13,47	0

A Figura 16 apresenta dados de consumo de ciprofloxacino pelo reator 2 em termos de θ_h com a concentração no afluente de 4,52 µg/L:

Figura 18 Consumo de 4,52 µg/L ciprofloxacino

5.3 Estimativa da constante cinética aparente (K_{app}) e Tempo de retenção mínimo

($\theta_{h, min}$)

Esta secção apresentará os constantes cinéticos aparentes (K_{app}) para cada condição avaliada nesta dissertação. Esses constantes foram estimadas por meio dos ajustes apresentados nas secções 5.1 e 5.2.

5.3.1 Reator 1 – Sulfametoxazol

A Tabela 17 apresenta os K_{app} da remoção de DQO do reator 1 que passou pela contaminação com sulfametoxazol.

Tabela 17 $K_{app, DQO}$ para o reator 1

C_{SMX} ($\mu\text{g/L}$)	$K_{app, DQO}$ (h^{-1})
0	0,60
1,95	0,60
23,20	0,55
41,34	0,58

A Figura 17 apresenta o efeito das várias concentrações do antibiótico na remoção de DQO no RAHLF. Esta figura demonstra a resistência do RAHLF a esses compostos tóxicos. A relação entre a concentração da sulfametoxazol e a constante cinética da consumpção de DQO apresentou-se insignificante até para concentrações do antibiótico bastante acima das concentrações encontradas em situações reais. Isso pode ser devido à configuração do biorreator em que o efeito do antibiótico, em algumas bactérias vulneráveis à sua ação, é anulado por outras bactérias que possuem resistência ao antimicrobiano. O ácido fólico não produzido por uma espécie pela interferência da sulfametoxazol pode ser repostado por outra espécie. Além disso, o escoamento tubular e a consequente estratificação dos processos

bioquímicos podem estar impedindo a ação da sulfametoxazol após um certo θ_h , que disponibilizaria o resto do comprimento do reator para a degradação de DQO eficiente.

Figura 19 Efeito da sulfametoxazol no funcionamento do reator 1

A Tabela 18 apresenta os valores da constante cinética aparente da remoção da sulfametoxazol ($K_{app, SMX}$) para cada fase da avaliação da remoção de sulfametoxazol.

Tabela 18 $K_{app, SMX}$ nas três fases do trabalho

C_{SMX} ($\mu\text{g/L}$)	$K_{app, SMX}$ (h^{-1})
1,95	0,83
23,20	1,06
41,34	0,31

Usando essas informações, uma relação interessante entre a concentração do antimicrobiano e o constante da remoção dele pode ser avaliada. A Figura 18 apresenta essa relação.

Figura 20 Relação entre C_{SMX} e $K_{app, SMX}$

Esta relação corresponde não a uma característica enzimática específica, e sim ao comportamento do RAHLF utilizado neste projeto. Mesmo assim, a relação possibilita um entendimento nos processos ocorrendo dentro desse RAHLF e pode ser utilizada para maior conhecimento sobre o comportamento do sistema, além de fazer hipóteses para próximos trabalhos em sistemas parecidos. Sendo apenas três pontos neste projeto, e devido à inconformidade do formato dos três pontos com modelos cinéticos mais comuns, foi inevitável escolher o ajuste polinomial que chegou a ser:

$$K_{app, SMX} = -0,001315(C_{SMX})^2 + 0,043465(C_{SMX}) + 0,755193 \quad (5.2)$$

Calculando o máximo desta parábola, é alcançado um valor limite de constante de remoção da sulfametoxazol de $1,11 \text{ h}^{-1}$ na concentração de $16,52 \text{ } \mu\text{g/L}$ de sulfametoxazol. Com um valor de $K_{\text{app, SMX}}$ máximo deduzido para o sistema, e com a C_{SMX} correspondente a esse $K_{\text{app, SMX}}$, é possível e conveniente calcular um tempo de retenção hidráulica mínimo ($\theta_{\text{h, min}}$) para a eliminação de alguma porcentagem específica da sulfametoxazol no efluente. A determinação desse $\theta_{\text{h, min}}$ pode seguir da equação 5.1, com pouca manipulação:

$$C_{\text{SMX,afluent}} = C_{0,\text{SMX}} e^{-K_{\text{app,max}} \theta_{\text{h,min}}}$$

$$e^{-K_{\text{app,max}} \theta_{\text{h,min}}} = \frac{C_{\text{SMX,afluent}}}{C_{0,\text{SMX}}}$$

$$-K_{\text{app,max}} \theta_{\text{h,min}} = \ln \left(\frac{C_{\text{SMX,afluent}}}{C_{0,\text{SMX}}} \right)$$

$$\theta_{\text{h,min}} = \frac{-1}{K_{\text{app,max}}} \ln \left(\frac{C_{\text{SMX,afluent}}}{C_{0,\text{SMX}}} \right)$$

$$\theta_{\text{h,min}} = \frac{-1}{K_{\text{app,max}}} \ln \left(\frac{C_{\text{SMX,afluent}}}{C_{0,\text{SMX}}} \right) \quad (5.3)$$

Utilizando a equação 5.3, pode-se construir uma tabela de tempos de retenção mínimos para remoções de certas porcentagens da sulfametoxazol, como na Tabela 19.

Tabela 19 $\theta_{\text{h, min}}$ para remoção de sulfametoxazol a eficiências variáveis

Remoção (%)	$\theta_{\text{h, min}}$ (h)
80,00	1,44
90,00	2,07
95,00	2,69
99,00	4,13
99,99	8,27

A Tabela 18 demonstra que, se um reator anaeróbio exibir comportamento comparável com o RAHLF deste projeto, o θ_h do reator, que geralmente é entre 6 e 8 horas, poderá ser suficiente para a remoção de entre 99% e 99,99%, se a concentração da sulfametoxazol estiver próxima a 16.52 $\mu\text{g/L}$.

Será importante observar que as concentrações de sulfametoxazol em esgoto doméstico são geralmente bem menores que este valor, e variam entre o traços não-detectáveis e 2 $\mu\text{g/L}$, (HIRSCH, TERNES, *et al.*, 1999) que é a menor concentração avaliada neste projeto. Para estes fins, o K_{app} da primeira fase que analisou a remoção de 1.95 $\mu\text{g/L}$ de sulfametoxazol seria mais relevante. θ_h requerido para a remoção do antibiótico em vários graus de eficiência pode ser calculado usando a equação 5.3, e algumas eficiências são avaliadas na Tabela 20.

Tabela 20 $\theta_{h, \min}$ para a remoção de 1,95 $\mu\text{g/L}$ de sulfametoxazol com várias eficiências

Remoção (%)	$\theta_{h, \min}$ (h)
80,00	1,93
90,00	2,76
95,00	3,59
99,00	5,52
99,99	11,03

A Tabela 20 demonstra que com um θ_h típico de 6 a 8 horas, poderá ter remoção de mais de 99% de sulfametoxazol em um reator anaeróbio horizontal de leito fixo, que é um resultado satisfatório e merece mais investigação.

5.3.2 Reator 2 – Ciprofloxacino

Na fase de análise que rendeu resultados tratáveis, o reator conseguiu metabolizar a ciprofloxacino até níveis abaixo do limite de quantificação. Será necessário abordar a questão

da cinética da ciprofloxacino em outros projetos, por motivo da carência de dados nesta discussão. Apesar disso, será possível fazer algumas observações sobre o comportamento do RAHLF operado nesse projeto sob condições que simulam o tratamento de esgoto doméstico.

Não foi observado um efeito significativo da ciprofloxacino na eficiência do RAHLF, como é apresentado na Tabela 21. O ajuste de consumo de DQO sem e com a contaminação com ciprofloxacino produziu constante cinéticos aparentes (K_{app}) para a remoção de matéria orgânica. A diferença pode ser considerada insignificante e devida a oscilações no sistema biológico mais do que o efeito do antibiótico.

Tabela 21 $K_{app, DQO}$ no reator 2 com e sem ciprofloxacino

$C_{cipro} (\mu g/L)$	$K_{app, DQO} (h^{-1})$
0	0,35
4,52	0,36

O reator 2 se mostrou resistente a concentrações uma ordem de magnitude acima da encontrada no afluente em algumas estações de tratamento de esgoto municipais. (CHANG, MEYER, *et al.*, 2010)

O K_{app} da remoção do antibiótico foi produzido com o ajuste exponencial e se apresentou com o valor de $0.28 h^{-1}$. Considerando esse valor, sendo obtido a partir da remoção comparável a concentrações reais encontradas em águas municipais, pode ser calculada uma série de θ_h para a remoção da ciprofloxacino em RAHLF com eficiências variáveis. Os valores da Tabela 22 foram obtidos a partir de cálculos com a equação 5.3.

Tabela 22 θ_h para remoção de ciprofloxacino em várias eficiências

Remoção (%)	$\theta_{h, \min}$ (h)
80,00	5,75
90,00	8,22
95,00	10,70
99,00	16,45
99,99	32,89

A Tabela 21 descreve a persistência maior da ciprofloxacino no RAHLF. Apesar da resistência do reator ao antimicrobiano, está evidente que a remoção do antibiótico não é ideal. Um RAHLF tratando efluente doméstico contaminado com ciprofloxacino com θ_h típico, entre 6 e 8 horas, poderia remover entre 80% e 90% do antimicrobiano.

6 Conclusões

Em termos de dados cinéticos da biodegradação de sulfametoxazol e ciprofloxacino, este projeto conseguiu ampliar alguns relacionados ao reator anaeróbio horizontal de leito fixo, e que podem servir como ponto de partida para avaliações em outras configurações. O RAHLF manifestou a sua capacidade de resistir a compostos tóxicos, especialmente antimicrobianos que são produzidos com o objetivo de neutralizar bactérias, que são os sítios dos processos biológicos do biorreator.

No caso do RAHLF alimentado com afluente contaminado com sulfametoxazol, foi evidente a resistência do sistema biológico à sulfametoxazol. A remoção de matéria orgânica não sofreu mudança significativa, mesmo em concentração de sulfametoxazol 20 vezes maior que as encontradas em águas residuárias municipais e rios. Além disso, a degradação da

sulfametoxazol ocorreu eficientemente, e foi simulado que um RAHLF com tempo de detenção hidráulica de 6 a 8 horas, que é o típico, conseguiria remover mais que 99% da sulfametoxazol presente em um afluente típico.

O RAHLF alimentado com esgoto sintético contaminado com ciprofloxacino apresentou resistência ao antimicrobiano, porém, não degradou a ciprofloxacino satisfatoriamente. Os 80% de remoção simulados para θ_h típico em RAHLF são esperançosos mas não suficientes. Sendo micropoluentes, o resíduo da degradação ainda pode ter efeitos negativos na saúde pública e no meio ambiente em geral.

Em ambos os casos, será importante ampliar mais trabalhos nos temas, e este projeto demonstrou que as técnicas e o conhecimento para a avaliação da cinética da remoção de antimicrobianos estão disponíveis. Os dados cinéticos produzidos neste projeto abrem as possibilidades de fazer novas hipóteses e as seguir.

Algumas metas sugeridas para futura investigação seriam:

- Procurar parâmetros cinéticos intrínsecos.
- Trabalhar com concentrações de antimicrobianos menores.
- Avaliar a produção de metabólitos da biodegradação dos antimicrobianos.

Referências

CHANG, X. et al. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1444-1450, May 2010.

DRILLIA, P. et al. 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, July 2005.

GALÁN, M. J. G. et al. LC-QqLIT MS analysis of nine sulfonamides and one of their acetylated metabolites in the Llobregat River basin. Quantitative determination and qualitative evaluation by IDA experiments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1325-1334, June 2010.

GALÁN, M. J. G.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1008–1022, December 2008.

HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 109-118, January 1999.

HOOPER, D. C. New Uses for New and Old Quinolones and the Challenge of Resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 2, p. 243-54, February 2010.

MARCHAIM, U. **Biogas processes for sustainable development**. Rome: FAO, 1992.

OLIVEIRA, S. V. W. B. et al. Formaldehyde degradation in an anaerobic packed-bed bioreactor. **Water Research**, v. 38, n. 7, p. 1685-94, April 2004.

RENEW, J. E.; HUANG, C.-H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1-2, n. 1042, p. 113-21, 2004.

TORRES, P. et al. **Evaluacion de sistemas combinados en el tratamiento de sustrato sintetico simulando agua residual domestica**. Seminario taller latinoamericano tratamiento anaerobio de aguas residuales. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 1996. p. 187-196.

WETZSTEIN, H. G.; SCHMEER, N.; KARL, W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4272-81, November 1997.

ZAIAT, M. **Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias**. São Carlos: EESC/USP, 2003.