

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

CAROLINE FABIANE GRANATTO

Remoção e degradação de fármacos e produtos de higiene em esgoto sanitário em reatores anaeróbios: estratégias de uso de cossustratos e caracterização taxonômica dos microrganismos

São Carlos

2021

CAROLINE FABIANE GRANATTO

Remoção e degradação de fármacos e produtos de higiene em esgoto sanitário em reatores anaeróbios: estratégias de uso de cossustratos e caracterização taxonômica dos microrganismos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Bernadete Amâncio Varesche
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini

São Carlos

2021

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).

G748r Granatto, Caroline Fabiane
Remoção e degradação de fármacos e produtos de higiene em esgoto sanitário em reatores anaeróbios: estratégias de uso de cossubstratos e caracterização taxonômica dos microrganismos / Caroline Fabiane Granatto; orientador Maria Bernadete Amâncio Varesche; coorientador Pedro Sérgio Padini. São Carlos, 2021.

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, 2021.

1. Diclofenaco. 2. Ibuprofeno. 3. Propranolol. 4. Triclosan. 5. LAS. 6. Micropoluentes Emergentes. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **CAROLINE FABIANE GRANATTO**.

Título da tese: " Remoção e degradação de fármacos e produtos de higiene em esgoto sanitário em reatores anaeróbios: estratégias de uso de cossustratos e caracterização taxonômica dos microrganismos".

Data da defesa: 10/03/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Associada **María Bernadete Amancio Varesche Silva**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

Dr. **Guilherme Martins Grosseli**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Dr. **Fabício Motteran**
(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovada

Prof. Dr. **Sérgio Francisco de Aquino**
(Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP)

Aprovada

Profa. Dra. **Flávia Talarico Saia**
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

Aprovada

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**

Ao Ulisses, meu companheiro de todos os momentos e meu grande amor.

À minha mãe Antônia e meu irmão Danilo, meus pilares.

Dedico.

Agradecimentos

Ao Ulisses, por ser meu companheiro na carreira profissional, acadêmica e, principalmente, na vida como um todo. Sua inteligência e leveza, com certeza, fazem minha vida mais feliz.

À minha mãe Antônia e irmão Danilo por todo apoio, encorajamento e amor.

À Prof^a Maria Bernadete, pela oportunidade de realizar um sonho e por ter me auxiliado a evoluir profissionalmente e pessoalmente. Sua orientação, incentivo e até mesmo conselhos pessoais foram muito importantes. Imensamente grata.

Ao Prof. Pedro e Guilherme, pela oportunidade, ajuda e dedicação para a realização deste trabalho.

Aos colegas e profissionais do LPB, obrigada pela parceria e conhecimento multidisciplinar compartilhado.

Aos meus amigos do “Sanca badalada”, que fizeram minha vida São Carlense mais feliz.

À família de longa data “Time azul” e, em especial, ao Gigante, por sempre ter me dado “uma mãozinha”.

À Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Programa de Pós-Graduação e Engenharia Hidráulica e Saneamento, Laboratório de Processos Biológicos (LPB), Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (LBGqA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-São Carlos).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) – Processo 140197/2018-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2015/06246-7.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

GRANATTO, C. F. **Remoção e degradação de fármacos e produtos de higiene em esgoto sanitário em reatores anaeróbios: estratégias de uso de cossubstratos e caracterização taxonômica dos microrganismos.** 2021. 229 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Diclofenaco (DCF), ibuprofeno (IBU), propranolol (PRO), triclosan (TCS) e *linear alkylbenzene sulfonate* (LAS) são recalcitrantes em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). A remoção desses compostos foi investigada em reator EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*), em escala aumentada (69L), alimentado com esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP (Brasil) e 200 mg L⁻¹ de etanol. O EGSB foi operado em três fases: (I) tempo de detenção hidráulico (TDH) de 36±4h; (II) TDH de 20±2h e (III) TDH de 20±2h com etanol. Entre as fases I e II, não houve diferença significativa da remoção de LAS (63±11-65±12%), DCF (37±18-35±11%), IBU (43±18-44±16%) e PRO (46±25-51±23%) para 13±2-15±2 mg L⁻¹, 106±32-462±294 µg L⁻¹, 166±55-462±213 µg L⁻¹ e 201±113-250±141 µg L⁻¹ afluente, respectivamente. Para TCS, obteve-se maior remoção na fase I (72±17% para 127±120 µg L⁻¹ afluente) em comparação a fase II (51±13% para 135±119 µg L⁻¹ afluente), devido a sua maior adsorção (40%) na fase inicial. Na fase III, observou-se maior remoção de DCF (42±10% para 107±26 µg L⁻¹ afluente), IBU (50±15% para 164±47 µg L⁻¹ afluente) e TCS (85±15% para 185±148 µg L⁻¹ afluente) e menor de LAS (35±14% para 12±3 mg L⁻¹ afluente) e PRO (-142±177% para 188±88 µg L⁻¹ afluente). Bactérias e arqueias semelhantes a *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Macellibacteroides*, *Syntrophus*, *Blvii28_wastewater-sludge_group*, *Bacteroides* e *Methanosaeta* (fase I); *Syntrophobacter* e *Methanosaeta* (fase II); *Smithella*, *Caldisericum* e *Methanobacterium* (fase III), foram identificadas. A produção de metano (*P*) de lodo granular submetido a DCF, IBU, TCS e PRO em esgoto sanitário em reatores em batelada e cossubstratos (200 mg L⁻¹ de matéria orgânica) na forma de etanol, metanol:etanol e fumarato foi avaliada. Etanol favoreceu maior produção de metano (*P*) em relação ao Controle (855±5 µmolCH₄), para os ensaios com DCF (43,20±0,01 mgDCF L⁻¹; 11.530±368 µmolCH₄), IBU (43,42±0,03 mgIBU L⁻¹; 10.583±512 µmolCH₄), TCS (5,10±0,10 mgTCS L⁻¹; 2.960±185 µmolCH₄) e PRO (55,90±1,20 mgPRO L⁻¹; 10.946±108 µmolCH₄). O uso de etanol resultou em maior remoção de DCF (28,24±1,10% para 43,20±0,01 mg L⁻¹), IBU (18,72±1,60% para 43,42±0,03 mg L⁻¹), TCS (93,70±0,80% para 5,10±0,10 mg L⁻¹) e PRO (26,61±0,78% para 55,90±1,20 mg L⁻¹). Entretanto, com 28,5±0,5 mgPRO L⁻¹, maior remoção (89,10±0,1%) foi obtida sem cossubstratos. *Smithella*, *Sulfuricurvum*, *Synthophus* e *Methanosaeta* foram identificadas nos ensaios de DCF e IBU com etanol. Em TCS com etanol identificou-se *Longilinea*, *Arcobacter*, *Mesotoga*, *Sulfuricurvum* e *Methanosaeta*. Para PRO sem cossubstrato, os gêneros *VadinBC27*, *Methanobacterium* e *Methanosaeta* foram mais abundantes. Por meio desta classificação taxonômica, as vias metabólicas dos possíveis microrganismos envolvidos na degradação anaeróbia de DCF, IBU, PRO e TCS foram propostas.

Palavras-chave: diclofenaco. ibuprofeno. propranolol. triclosan. LAS. micropoluentes emergentes

ABSTRACT

GRANATTO, C. F. **Removal and degradation of drugs and hygiene products in sanitary sewage in anaerobic reactors: strategies for the use of cosubstrates and taxonomic characterization of microorganisms.** 2021. 229 p. Thesis (Doctorate) - São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2021.

Diclofenac (DCF), ibuprofen (IBU), propranolol (PRO), triclosan (TCS) and linear alkylbenzene sulfonate (LAS) are recalcitrant in Wastewater Treatment Plant (WWTP). The removal of these compounds was investigated in an EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) reactor (69L), fed with sanitary sewage influent to the São Carlos-SP (Brazil) WWTP and 200 mg L⁻¹ of ethanol. The EGSB was operated in three phases: (I) hydraulic retention time (HRT) of 36±4h; (II) HRT of 20±2h and (III) HRT of 20±2h with ethanol. Between phases I and II, there was no significant difference in the removal of LAS (63±11-65±12%), DCF (37±18-35±11%), IBU (43±18-44±16%) and PRO (46±25-51±23%) for 13±2-15±2 mg L⁻¹, 106±32-462±294 µg L⁻¹, 166±55-462±213 µg L⁻¹ and 201±113-250±141 µg L⁻¹ influent, respectively. For TCS, greater removal was obtained in phase I (72±17% for influent 127±120 µg L⁻¹) compared to phase II (51±13% for 135±119 µg L⁻¹ influent), due to its greater adsorption (40%) in the initial phase. In phase III, greater removal of DCF (42±10% for 107±26 µg L⁻¹ influent), IBU (50±15% for 164±47 µg L⁻¹ influent) and TCS (85±15% for 185±148 µg L⁻¹ influent) and lower than LAS (35±14% for 12±3 mg L⁻¹ influent) and PRO (-142±177% for 188±88 µg L⁻¹ influent) was observed. Bacteria and archaea similar to *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Macellibacteroides*, *Syntrophus*, *Blvii28_wastewater-sludge_group*, *Bacteroides* and *Methanosaeta* (phase I); *Syntrophobacter* and *Methanosaeta* (phase II); *Smithella*, *Caldisericum* and *Methanobacterium* (phase III), were identified. Methane production (P) of granular sludge subjected to DCF, IBU, TCS and PRO in sanitary sewage in batch reactors and cosubstrates (200 mg L⁻¹ of organic matter) in the form of ethanol, methanol: ethanol and fumarate was evaluated. Ethanol favored a higher methane production (P) compared to the Control (855 ± 5 µmolCH₄), for the essays with DCF (43.20 ± 0.01 mgDCF L⁻¹; 11,530±368 µmolCH₄), IBU (43.42±0.03 mgIBU L⁻¹; 10,583±512 µmolCH₄), TCS (5.10±0.10 mgTCS L⁻¹; 2.960±185 µmolCH₄) and PRO (55.90±1.20 mgPRO L⁻¹; 10.946±108 µmolCH₄). The ethanol use resulted in greater removal of DCF (28.24±1.10% for 43.2 ±0.01 mg L⁻¹), IBU (18.72±1.60% for 43.42±0, 03 mg L⁻¹), TCS (93.70±0.80% for 5.10±0.10 mg L⁻¹) and PRO (26.61±0.78% for 55.90±1.20 mg L⁻¹). However, with 28.5±0.5 mgPRO L⁻¹, greater removal (89.10±0.1%) was achieved without cosubstrates. *Smithella*, *Sulfuricurvum*, *Synthophus* and *Methanosaeta* were identified in the assays with DCF and IBU with ethanol. In TCS with ethanol, *Longilinea*, *Arcobacter*, *Mesotoga*, *Sulfuricurvum* and *Methanosaeta* were identified. For PRO without cosubstrate, the genera *VadinBC27*, *Methanobacterium* and *Methanosaeta* were more abundant. Through this taxonomic classification, the metabolic pathways of possible microorganisms involved in the anaerobic degradation of DCF, IBU, PRO and TCS were proposed.

Keywords: diclofenac. ibuprofen. propranolol. triclosan. LAS. emerging micropollutants

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 - Rota de contaminação de micropoluentes emergentes..... | 32 |
| Figura 2.2 - Diagrama de partição generalizado do comportamento de substâncias químicas em função de log Kow..... | 40 |
| Figura 2.3 - Molécula de LAS..... | 42 |
| Figura 2.4 - Representação esquemática das etapas da digestão anaeróbia, incluindo os papéis das enzimas hexoquinase (HK), acetato cinase (AK) e fosfotransacetilase (PTA)..... | 48 |
| Figura 2.5 - Estrutura molecular e funções orgânicas de ibuprofeno, LAS, propranolol, diclofenaco e triclosan. | 52 |
| Figura 2.6 - Desalogenação anaeróbia de polihalogenados via hidrogenólise (1) e hidrólise (2). | 54 |
| Figura 2.7 - Via de degradação inicial do diclofenaco por fotólise direta proposta por Leydy et al., (2019). | 55 |
| Figura 2.8 - Via de formação de dímeros, a partir de diclofenaco, proposto por Keen et al., (2013). | 55 |
| Figura 2.9 - Unidade básica dos subprodutos gerados durante a transformação do diclofenaco (carbozol)..... | 56 |
| Figura 2.10 - Via de degradação do triclosan em condições anaeróbias..... | 57 |
| Figura 2.11 - Via de oxidação eletroquímica do propranolol..... | 58 |
| Figura 2.12 - Subprodutos da degradação de ibuprofeno por foto-transformação..... | 59 |
| Figura 2.13 - Rota da degradação anaeróbia de LAS..... | 60 |
| Figura 2.14 - Fenilacetado do diclofenaco. | 61 |
| Figura 2.15 - Benzoatos substituídos que podem ser degradados via degradação anaeróbia de benzoil-CoA..... | 61 |
| Figura 2.16 - Benzoil-CoA. | 62 |
| Figura 2.17 - Intermediário central comum na degradação anaeróbia de anéis aromáticos (benzoil-CoA) | 62 |
| Figura 2.18 - Degradação anaeróbia de benzoil-CoA pela via independente de ATP. Os nomes de proteínas correspondem a <i>Geobacter metallireducens</i> | 63 |
| Figura 4.1 - Fluxograma experimental..... | 66 |
| Figura 4.2 - Esquema do Reator EGSB em escala aumentada..... | 69 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.3 - Laboratório no interior da Estação de Tratamento de Esgoto de São Carlos – SP..... | 70 |
| Figura 4.4 - Reator EGSB em escala aumentada: (1) Pontos de amostragem (12 Pontos), (2) Parte em PVC (3,1 m), (3) Parte em acrílico (1 m), (4) Lodo adensado, (5) Bomba de recirculação do efluente (diafragma) e (6) Bomba de alimentação (diafragma)..... | 70 |
| Figura 4.5 - Bomba utilizada para captação do esgoto sanitário pós tratamento preliminar da ETE de São Carlos-SP (A), caixa de 500L utilizada para armazenar o esgoto sanitário afluente ao reator EGSB (B) e caixa completa com esgoto sanitário (C)..... | 71 |
| Figura 4.6 - Retirada do pé de crivo para manutenção (A), sólidos presos no pé de crivo (B) e pé de crivo após a limpeza (C)..... | 71 |
| Figura 4.7 - Extração em fase sólida (SPE - <i>solid-phase extraction</i>) dos compostos alvos (A) e secagem a vácuo até à secura (B). | 74 |
| Figura 4.8 - Extratos sendo evaporados até à secura sob corrente de nitrogênio (A) e amostras reconstituídas em metanol-água (B). | 74 |
| Figura 4.9 - Granulometria do lodo de inóculo e dos lodos do reator EGSB ao final de cada fase de operação. | 79 |
| Figura 5.1 - Produção de metano dos reatores em bateladas contendo diclofenaco (A) e ibuprofeno (B)..... | 84 |
| Figura 5.2 - Ácidos orgânicos voláteis no esgoto sanitário inicial de todos os ensaios (ES) e ao final dos ensaios de reatores em bateladas Controle, diclofenaco (A) e ibuprofeno (B)..... | 88 |
| Figura 5.3 - Concentração inicial e eficiência de remoção da matéria orgânica dos ensaios contendo diclofenaco (A) e ibuprofeno (B)..... | 90 |
| Figura 5.4 - Rendimento de metano dos ensaios contendo diclofenaco (A) e ibuprofeno (B) na ausência de cossustrato (D4 e I4) e presença de fumarato (DF e IF), etanol (DE e IE) e metanol:etanol (DM e IM)..... | 93 |
| Figura 5.5 - Curva de rarefação dos ensaios de reatores em bateladas de maior remoção de diclofenaco (DE) e ibuprofeno (IE) utilizando etanol como cossustrato..... | 98 |
| Figura 5.6 - Abundância relativa dos Filos do Domínio Bacteria na biomassa ao final da operação dos reatores em bateladas contendo etanol e diclofenaco (A) e etanol e ibuprofeno (B). | 99 |
| Figura 5.7 - Gêneros de maior abundância relativa (>0,02%) do Domínio Bacteria identificados na biomassa ao final da operação dos reatores contendo etanol e diclofenaco (DE) e etanol e ibuprofeno (IE). | 100 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.8 - Abundância relativa dos gêneros identificados do Domínio Archaea nos reatores em bateladas contendo etanol e diclofenaco (DE) (A) e etanol e ibuprofeno (IE) (B)..... | 103 |
| Figura 5.9 - Diagrama metabólico das possíveis rotas de degradação de DCF e IBU e interações microbianas anaeróbias em esgoto sanitário com etanol como cossubstrato..... | 106 |
| Figura 5.10 - Ácidos orgânicos voláteis ao final dos ensaios contendo triclosan (A) e propranolol (B) sem cossubstratos. | 111 |
| Figura 5.11 - Produção de metano dos reatores em bateladas contendo triclosan (A) e propranolol (B)..... | 113 |
| Figura 5.12 - Ácidos orgânicos voláteis ao final dos ensaios contendo triclosan (A) e propranolol (B) na ausência de cossubstratos (T2 e P4) e presença dos cossubstratos fumarato (TF e PF), etanol (TE e PE) e metanol:etanol (TM e PM)..... | 119 |
| Figura 5.13 - Curva de rarefação dos ensaios de reatores em bateladas de maior remoção de triclosan (TE) utilizando etanol e propranolol (P3) na ausência de cossubstrato..... | 120 |
| Figura 5.14 - Abundância relativa dos Filos do Domínio Bacteria na biomassa ao final da operação dos reatores em bateladas contendo triclosan e etanol (A) e propranolol (B)..... | 121 |
| Figura 5.15 - A: Gêneros de abundância relativa maior que 0,1% do Domínio Bacteria identificados na biomassa microbiana ao final da operação dos reatores contendo TCS e etanol (TE) e PRO (P3). B: Principais atividades metabólicas exercidas pelos microrganismos pertencentes aos gêneros identificados com abundância relativa maior que 0,1% do Domínio Bacteria. | 125 |
| Figura 5.16 - Vias da degradação de triclosan e propranolol baseadas em Veetil et al., (2012) e García-Espinoza e Mijaylova Nacheva, (2019), respectivamente..... | 126 |
| Figura 5.17 - Abundância relativa dos gêneros identificados do Domínio Archaea nos lodos ao final da operação dos reatores contendo TCS e etanol em TE e PRO em P3..... | 129 |
| Figura 5.18 - A: Box Plot do diâmetro dos grânulos do lodo de inóculo e do reator EGSB para as fases I, II e III. B: Frequência (%) das faixas granulométricas (mm) observadas para o lodo de inóculo e para o lodo do reator EGSB das fases I, II e III..... | 131 |
| Figura 5.19 - A: Variação temporal da alcalinidade total efluente e afluente ao reator EGSB e relação entre alcalinidade intermediária e parcial (AI/AP). B:Box Plot da alcalinidade total efluente e afluente ao reator EGSB..... | 133 |
| Figura 5.20 - A: Variação temporal dos ácidos orgânicos voláteis total (AOV) efluente e afluente ao reator EGSB. B: Box Plot dos ácidos orgânicos voláteis totais efluente e afluente ao reator EGSB..... | 135 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.21 - A: Variação temporal da matéria orgânica afluyente, efluente e remoção ao longo da operação do reator EGSB. B: Box Plot da matéria orgânica afluyente e efluente ao longo da operação do reator EGSB..... | 137 |
| Figura 5.22 - Média das concentrações de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS no esgoto sanitário afluyente ao reator EGSB..... | 142 |
| Figura 5.23 - Comparação da temperatura ambiente do local onde o reator EGSB foi operado (ETE de São Carlos-SP) (A) com a do município de São Carlos-SP (B)..... | 143 |
| Figura 5.24 - A: Remoção média dos micropoluentes e LAS em EGSB. B: Box Plot da remoção dos micropoluentes e LAS em EGSB..... | 145 |
| Figura 5.25 - Balanço de massa de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em EGSB..... | 147 |
| Figura 5.26 - A: Estrutura molecular de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS. B: Mapa de superfície do potencial eletrostático..... | 150 |
| Figura 5.27 - Curva de rarefação nos lodos de todas das fases de operação do reator EGSB.... | 151 |
| Figura 5.28 - Variação dos índices de diversidade e riqueza bacteriana nos lodos de todas as fases de operação do reator EGSB..... | 152 |
| Figura 5.29 - Abundância relativa (>2,5%) dos principais Filos bacterianos identificados no lodo de todas as fases de operação do reator EGSB..... | 153 |
| Figura 5.30 - Gêneros do Domínio Bacteria identificados com abundância relativa acima de 0,1% nos lodos de todas as fases de operação do reator EGSB..... | 155 |
| Figura 5.31 - A: Fluxograma de rotas metabólicas de tratamento de DCF, TCS, IBU, PRO e LAS e predominância do metabolismo microbiano envolvido em cada fase de operação EGSB. B: Total das abundâncias relativas dos gêneros do Domínio Bacteria identificados no lodo de todas as fases de operação do EGSB relacionados ao metabolismo microbiano envolvido na degradação de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS..... | 162 |
| Figura 5.32 - Gêneros do Domínio Archaea identificados no lodo de todas as fases de operação do reator EGSB..... | 164 |
| Figura A1 - Bomba de diafragma para alimentação do reator..... | 215 |
| Figura A2 - Caixa de alimentação do reator. | 216 |
| Figura A3 - Tomada da bomba do preliminar..... | 217 |
| Figura A4 - Esgoto jorrando na caixa de alimentação do reator..... | 217 |
| Figura A5 - Bomba centrífuga instalada no tratamento preliminar da ETE de São Carlos – SP. | 219 |
| Figura A6 - Retirando o pé de crivo da bomba instalada no tratamento preliminar da ETE..... | 220 |
| Figura A7 - Limpeza do pé de crivo da bomba instalada no tratamento preliminar da ETE..... | 221 |

| | |
|---|-----|
| Figura A8 - Procedimento utilizado para preparo e sequenciamento das amostras genômicas. | 222 |
| Figura A9 - Procedimento para análise dos dados. | 223 |
| Figura A10 - Análise estatística do número de tags e OTUs de cada amostra..... | 226 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 - Micropoluentes emergentes em esgoto sanitário e águas residuárias..... | 33 |
| Tabela 2.2 - Micropoluentes emergentes em águas superficiais, subterrâneas e solos..... | 34 |
| Tabela 2.3 - Micropoluentes emergentes em águas superficiais sem e com influência antropogênica..... | 34 |
| Tabela 2.4 - Efeitos sinérgicos da mistura de produtos farmacêuticos e de higiene em diferentes organismos. | 38 |
| Tabela 2.5 - Características físico-químicas de diclofenaco ibuprofeno, propranolol e triclosan. | 41 |
| Tabela 2.6 - Remoção de micropoluentes emergentes em sistema de lodos ativados..... | 43 |
| Tabela 2.7 - Remoção de micropoluentes emergentes em reatores anaeróbios..... | 44 |
| Tabela 2.8 - Comparação de eficiência de remoção de matéria orgânica e LAS em reatores EGSB em escala de bancada e escala aumentada para diferentes TDH..... | 46 |
| Tabela 2.9 - Resumo dos trabalhos mais recentes realizados no LPB para remoção de micropoluentes emergentes..... | 51 |
| Tabela 4.1 - Condições operacionais dos ensaios de diclofenaco e ibuprofeno..... | 68 |
| Tabela 4.2 - Condições operacionais dos ensaios de triclosan e propranolol..... | 68 |
| Tabela 4.3 - Relação/fator de equivalência das reações de oxidação completa dos cossustratos..... | 69 |
| Tabela 4.4 - Fases de operação do reator EGSB..... | 72 |
| Tabela 4.5 - Concentração dos micropoluentes emergentes adicionados na caixa de alimentação do reator EGSB durante todas suas fases de operação..... | 73 |
| Tabela 4.6 - Relação/fator de equivalência da reação de oxidação completa do cossustrato etanol. | 73 |
| Tabela 4.7 - Frequência e método das análises físico-químicas e cromatográficas realizadas para os reatores em bateladas e reator EGSB em escala aumentada..... | 77 |
| Tabela 4.8 - Número de acesso dos dados de sequenciamento depositados no GenBank..... | 80 |
| Tabela 4.9 - Equacionamentos empregados para os cálculos das variáveis respostas utilizadas para avaliação dos ensaios em reatores em bateladas..... | 81 |
| Tabela 5.1 - Concentração dos micropoluentes emergentes na amostra composta de esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP..... | 82 |
| Tabela 5.2 - Parâmetros de Gompertz de potencial metanogênico para os reatores com diclofenaco e ibuprofeno..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 5.3 - Reações envolvidas no processo sintrófico de formação de metano..... | 87 |
| Tabela 5.4 - Eficiência da remoção de matéria orgânica dos ensaios de reatores em bateladas dos fármacos diclofenaco e ibuprofeno..... | 91 |
| Tabela 5.5 - Remoção, adsorção e degradação de diclofenaco e ibuprofeno em reatores em bateladas..... | 94 |
| Tabela 5.6 - pH, alcalinidade total e ácidos orgânicos voláteis totais (AOV) dos ensaios de reatores em bateladas de diclofenaco e ibuprofeno..... | 95 |
| Tabela 5.7 - Índices ecológicos dos Domínios Bacteria e Archaea dos ensaios de reatores em bateladas de maior remoção de diclofenaco (DE) e ibuprofeno (IE) utilizando etanol como cossustrato..... | 98 |
| Tabela 5.8 - Parâmetros de Gompertz de potencial metanogênico para os reatores com com triclosan e propranolol..... | 110 |
| Tabela 5.9 - Eficiência de remoção da matéria orgânica dos ensaios com triclosan e propranolol..... | 111 |
| Tabela 5.10 - pH, alcalinidade total e ácidos orgânicos voláteis totais (AOV) dos ensaios de reatores em bateladas de triclosan e propranolol..... | 112 |
| Tabela 5.11 - Remoção, adsorção e degradação de triclosan e propranolol em reatores em batelada..... | 114 |
| Tabela 5.12 - Índices ecológicos dos Domínios Bacteria e Archaea dos ensaios de reatores em bateladas de maior remoção de triclosan (TE) utilizando etanol e propranolol (P3) na ausência de cossustrato. | 120 |
| Tabela 5.13 - Sólidos do reator EGSB..... | 130 |
| Tabela 5.14 - Parâmetros de operação do afluente e efluente do reator EGSB..... | 133 |
| Tabela 5.15 - Ácidos orgânicos voláteis e álcoois no esgoto sanitário afluente e efluente ao reator EGSB..... | 140 |
| Tabela 5.16 - Remoção dos micropoluentes emergentes e LAS no reator EGSB..... | 144 |
| Tabela 5.17 - Índices ecológicos dos Domínios Bacteria e Archaea dos lodos de todas as fases de operação do reator EGSB..... | 151 |
| Tabela 5.18 - Total das abundâncias relativas dos gêneros do Domínio Bacteria identificados no lodo de todas as fases de operação do reator EGSB relacionados ao metabolismo microbiano envolvido na degradação de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS e ao sintrofismo com arqueias..... | 159 |
| Tabela 7.1 – Descrição das hipóteses, resultados obtidos e conclusões..... | 172 |
| Tabela A1 - QC Stat..... | 225 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ác: ácido

AK: acetato quinase

AOV: ácidos orgânicos voláteis

AOVt: ácidos orgânicos voláteis total

ARLC: água residuária de lavanderia comercial

ATP: adenosina trifosfato

ME: micropoluento emergente

COE: carga orgânica específica

CoA: coenzima A

GWRC: *Global Water Research Coalition*

DCF: diclofenaco

DCP: diclorofenol

DNA: ácido desoxirribonucleico

DQO: demanda química de oxigênio

EESC: Escola de Engenharia de São Carlos

EGSB: *Expanded Granular Sludge Bed*

ESI: íon eletro-pulverizador

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

EtOH: etanol

HK: hexoquinase

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

H0: hipótese nula

IBU: ibuprofeno

K_d : coeficiente de distribuição água-lodo

K_{ow} : coeficiente de partição octanol/água

LAS: *linear alkylbenzene sulfonate*

LBGqA: Laboratório de Biogeoquímica Ambiental

LC_{50} : *Lethal Dose* (dose letal para 50% dos indivíduos expostos)

Log K_{ow} : coeficiente de partição octanol/água expressos na forma logarítmica

LPB: Laboratório de Processos Biológicos

MetOH: metanol

MM: massa molecular

MRM: monitoração de reação múltipla

MS: Espectrômetro de Massa

MTCS: metiltriclosan

NADH: Dinucleótido de nicotinamida

NI: ionização negativa

NF: nonilfenol

OTU: unidades taxonômicas operacionais

pK_a : constante de acidez

PPGSHS: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento

PRO: propranolol

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI: ionização positiva

PTA: fosfotransacetilase

p-valor: probabilidade de se observar uma diferença tão grande ou maior do que a que foi observada sob a hipótese nula

Q = vazão afluente/efluente ao reator EGSB

RLF: reator de leito fluidificado

RNA: ácido ribonucleico

RNAr: RNA ribossomal

SAAE: Serviço Autônomo de Água e Esgoto

SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

ST: sólidos totais

STF: sólidos totais fixos

STV: sólidos totais voláteis

SPE: *solid-phase extraction*

T = tempo

TCS: triclosan

TDH: tempo de detenção hidráulico

TRL: tempo de retenção de lodo

UASB: *Upflow anaerobic sludge blanket*

UFSCar: Universidade Federal de São Carlos

UPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas

USP: Universidade de São Paulo

UV: ultravioleta

V = volume

X = massa do contaminante de interesse

[X] = concentração do contaminante de interesse

X_{rem} = massa do contaminante de interesse removido por processos biológicos e físicos

X_{aflu} = massa do contaminante de interesse no afluente; X_{eflu} = massa do contaminante de interesse no efluente

X_{biodeg} = massa do contaminante de interesse removido por processos biológicos

X_{ads} = massa do contaminante de interesse adsorvido na biomassa

$X_{(\text{afl/efl})}$ = massa do contaminante de interesse acumulado no afluente/efluente

X_{adsEGSB} = massa do contaminante de interesse adsorvido na biomassa do reator EGSB ao final de cada de operação

2,4-DCP: 2,4-diclorofenol

2,8-DCDD: 2,8-diclorodibenzoparadioxina

Φ_{sat} : ponto de saturação

α = média da concentração do contaminante de interesse extraído da biomassa do EGSB ao final de cada de operação

β = sólidos totais do lodo do reator EGSB ao final de cada de fase de operação

LISTA DE UNIDADES

atm: pressão atmosférica

cm: centímetro

g: grama

g L⁻¹: grama por litro

g mol⁻¹: massa em gramas por mol de entidades elementares

gDQO gEtOH⁻¹: grama de demanda química de oxigênio por grama de etanol

gDQO gMetOH⁻¹: grama de demanda química de oxigênio por grama de metanol

gDQO gFum⁻¹: grama de demanda química de oxigênio por grama de fumarato

gDQO L⁻¹ d⁻¹: grama de demanda química de oxigênio por litro por dia

gSTV L⁻¹: grama de sólidos totais voláteis por litro

h: hora

kV: quilovolt

L: litro

L h⁻¹: litro por hora

Log: logaritmo

mg: miligrama

ml: mililitro

m: metro

mm: milímetro

min: minutos

m²: metro quadrado

m³: metro cúbico

mol: massa molecular de uma substância expressa em gramas

mbar: milibar

mg L⁻¹: miligrama por litro

ml min⁻¹: mililitro por minuto

mg gST⁻¹: miligrama por grama de sólidos totais

mg gSTV⁻¹ d⁻¹: miligrama por grama de sólidos totais voláteis por dia

mgDQO L⁻¹: mg de demanda química de oxigênio por litro

mgDCF L⁻¹: miligrama de diclofenaco por litro

mgIBU L⁻¹: miligrama de ibuprofeno por litro

mgPRO L⁻¹: miligrama de propanolol por litro

mgTCS L⁻¹: miligrama de triclosan por litro

mgCaCO₃ L⁻¹: miligrama de carbonato de cálcio por litro

mgHAC L⁻¹: miligrama de ácido acético por litro

mgDQO L⁻¹ d⁻¹: miligrama de demanda química de oxigênio por litro por dia

mgDQO gSTV⁻¹ d⁻¹: miligrama de demanda química de oxigênio por grama de sólidos totais voláteis por dia

ng: nanograma

ng L⁻¹: nanograma por litro

Pa: Pascal

rpm: rotação por minuto

°C: graus celsius

μL: microlitro

μg L⁻¹: micrograma por litro

%: porcentagem

μmol: massa molecular de uma substância expressa em microgramas

$\mu\text{mol ml}^{-1}$: micro mol por mililitro

$\mu\text{mol h}^{-1}$: micro mol por hora

$v v^{-1}$: volume por volume

μm : micrômetro

$\mu\text{molCH}_4 \text{ mgDQO}^{-1}$: micro mol de metanol por miligrama de demanda química de oxigênio

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| 1. Introdução..... | 27 |
| 2. Revisão bibliográfica..... | 30 |
| 2.1. Micropoluentes Emergentes..... | 30 |
| 2.2. Toxicidade e ocorrência dos micropoluentes emergentes em diferentes matrizes | 32 |
| 2.3. Remoção de Micropoluentes Emergentes | 40 |
| 2.4. Reator anaeróbio de leito granular expandido | 45 |
| 2.5. Cossustratos metabólicos | 46 |
| 2.6. Degradação dos micropoluentes emergentes e bactérias envolvidas no processo | 52 |
| 3. Hipóteses e Objetivos | 64 |
| 4. Material e Métodos..... | 65 |
| 4.1. Delineamento experimental geral..... | 65 |
| 4.2. Micropoluentes emergentes e esgoto Sanitário | 66 |
| 4.3. Inóculo..... | 67 |
| 4.4. Reatores em bateladas | 67 |
| 4.5. Reator EGSB em escala aumentada..... | 69 |
| 4.6. Métodos físico-químicos e cromatográficos..... | 73 |
| 4.7. Balanço de massa | 77 |
| 4.8. Análise granulométrica | 78 |
| 4.9. Caracterização taxonômica..... | 79 |
| 4.10. Análises estatísticas e ajuste ao modelo de Gompertz..... | 80 |
| 5. Resultados e Discussão | 82 |
| 5.1. Reatores em bateladas | 82 |
| 5.1.1. Caracterização do esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP | 82 |
| 5.1.2. Potencial metanogênico e remoção de diclofenaco e ibuprofeno..... | 83 |
| 5.1.2.1. Diversidade microbiana dos reatores de maior remoção de diclofenaco e ibuprofeno | 97 |
| 5.1.3. Potencial metanogênico e remoção de triclosan e propranolol | 108 |
| 5.1.3.1. Diversidade microbiana dos reatores de maior remoção de triclosan e propranolol | 119 |
| 5.2. Reator EGSB em escala aumentada..... | 130 |
| 5.2.1. Remoção da matéria orgânica | 130 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.3. Remoção de diclofenaco, ibuprofeno, propranolol, triclosan e LAS em reator EGSB | 141 |
| 5.2.4. Caracterização microbiana do reator EGSB | 151 |
| 6. Considerações Finais | 166 |
| 7. Respostas às hipóteses | 169 |
| 8. Conclusões | 172 |
| 9. Sugestões para trabalhos futuros | 175 |
| 10. Referências bibliográficas | 176 |
| APÊNDICE..... | 214 |
| ANEXO | 221 |

1. Introdução

A Agenda 2030 das Nações Unidas propõem o desenvolvimento de pesquisas, no âmbito de biorremediação de micropoluentes emergentes, para o gerenciamento sustentável de recursos hídricos (UNITED NATIONS, 2015). Dentre a enorme gama destes poluentes, fármacos e produtos de higiene pessoal têm recebido grande atenção (MOLINA et al., 2020; USMAN; FAROOQ; HANNA, 2020). Isso porque, devido a maior expectativa de vida da população, a produção e consumo de produtos farmacêuticos e de higiene tem aumentado (MOLINA et al., 2020; USMAN; FAROOQ; HANNA, 2020). Exemplos desses micropoluentes emergentes são os fármacos diclofenaco (DCF), ibuprofeno (IBU) e propranolol (PRO), o bactericida triclosan (TCS) e o surfactante *linear alkylbenzene sulfonate* (LAS). Tais compostos são recalcitrantes em estações de tratamento de esgoto (ETE) de todo o mundo (LUO et al., 2014; CAMPANHA et al., 2015; GONZALEZ-GIL et al., 2016; YANG et al., 2016).

Quando os micropoluentes emergentes estão presentes no ambiente podem ocasionar efeitos adversos à diferentes níveis tróficos da biota, como desregulação endócrina à fauna, toxicidade à flora e prejudicar o processo de depuração natural de corpos aquáticos (RAUT e ANGUS, 2010; RICART et al., 2010; PETERSEN; HEIAAS; TOLLEFSEN, 2014; USMAN et al., 2020). Soma-se a isso o fato de favorecerem cepas bacterianas resistentes a alguns antibióticos e induzir a transferência horizontal desses genes às bactérias patogênicas aos seres humanos (MCNAMARA, LAPARA, e NOVAK 2014; CAREY et al. 2016). Nesse cenário, destaca-se a importância de pesquisas relacionadas a biorremediação de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS, sendo necessário buscar alternativas para favorecer maior degradação desses compostos.

O reator *Expanded Granular Sludge Bed* (EGSB), em escala de bancada e aumentada, tem sido empregado para remoção de micropoluentes (DELFORNO et al., 2012; GRANATTO et al., 2019). Trata-se de tecnologia alternativa ao UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*), porquê na configuração do EGSB tem-se recirculação do efluente e, por conseguinte, diluição de compostos tóxicos e recalcitrantes. Além disso, há maior velocidade ascensional em comparação ao UASB, que promove expansão do leito e melhora o contato substrato-biomassa (DELFORNO et al., 2012; OKADA et al., 2013).

Todavia, a recalcitrância de micropoluentes em ETE está relacionada a diversos fatores, tais como as características físico-química dos micropoluentes e tempo de detenção

hidráulico (TDH) aplicado ao reator (GROS et al., 2010; MALMBORG e MAGNÉR, 2015; YANG et al., 2016). Por exemplo, DCF, IBU, PRO, TCS e LAS são constituídos de anéis aromáticos, tornando-os recalcitrantes a degradação anaeróbia devido a energia de ressonância que estabiliza a estrutura do anel (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011). A densidade eletrônica de sistemas aromáticos reduz a biodisponibilidade das moléculas para serem utilizadas como receptores de elétrons pelos microrganismos (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GHATTAS et al., 2017). Além disso, micropoluentes de estruturas moleculares complexas, tais como DCF, IBU, PRO, TCS e LAS, podem ser tóxicos a comunidade microbiana anaeróbia (SYMSARIS et al., 2015; REYES-CONTRERAS et al., 2019; FAN et al., 2020). Nesse contexto, a utilização de fontes doadoras de elétrons, como os cossustratos etanol e metanol, pode ser favorável a atividade microbiana anaeróbia para degradar poluentes complexos e recalcitrantes (MOTTERAN et al., 2018; MACEDO et al., 2020). O uso de fumarato também pode favorecer energeticamente a degradação anaeróbia de compostos aromáticos (MOTTERAN et al., 2020), pois em uma das vias anaeróbias para quebra de hidrocarbonetos aromáticos há adição e regeneração de fumarato (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011).

Diante do exposto, um dos objetivos do presente estudo foi investigar a remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em reator EGSB em escala aumentada alimentado com esgoto sanitário afluyente a ETE de São Carlos-SP (Brasil). Foram empregados diferentes TDH ao reator, bem como o cossustrato etanol, para averiguar a eficiência de remoção dos contaminantes.

Neste estudo, objetivou-se também avaliar, em reatores em batelada, o potencial metanogênico de lodo granular submetido a diferentes concentrações de DCF, IBU, PRO e TCS. A influência dos cossustratos etanol, fumarato e combinação de metanol com etanol no potencial metanogênico e na remoção desses micropoluentes emergentes também foi investigada.

A partir da caracterização de bactérias e arqueias, por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S via plataforma Illumina Miseq, de todas as fases operacionais do EGSB e dos reatores em batelada, foi possível identificar bactérias e arqueias metanogênicas e inferir sobre possíveis vias metabólicas de degradação anaeróbia de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS.

Por meio da execução desta pesquisa pretendeu-se fornecer *insights* sobre os mecanismos de transformação anaeróbia de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário

em reator contínuo para biorremediação desses compostos recalcitrantes, tal como o uso de cossustrato para o favorecimento da degradação. Além disso, a partir das características físico-químicas dos contaminantes foi explorado os seus diferentes efeitos tóxicos exercidos na comunidade microbiana anaeróbia. Essa investigação preenche lacunas científicas e propõe estratégias para a remoção de fármacos e produtos de higiene pessoal em águas residuárias e esgoto sanitário.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Micropoluentes Emergentes

Micropoluentes emergentes são substâncias químicas sintéticas ou naturais que são introduzidos no ambiente, podendo causar efeitos adversos conhecidos ou suspeitos a organismos do ecossistema e/ou à saúde humana. Tais poluentes contemplam compostos recém-sintetizados ou que estavam presentes no ambiente há anos, e foram detectados devido aos avanços nas técnicas analíticas (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013). Exemplos são produtos farmacêuticos, de higiene pessoal, edulcorantes, plastificantes, pesticidas, entre outros.

Dentre a enorme gama de micropoluentes emergentes, fármacos e produtos de higiene pessoal têm recebido grande atenção (MOLINA et al., 2020; USMAN et al., 2020). Isso por causa da incidência desses compostos em águas residuárias, esgoto sanitário e ambiente (VAN DER AA et al., 2011; PATEL et al., 2019; USMAN et al., 2020). Além disso, devido a maior expectativa de vida da população, a demanda e consumo de produtos farmacêuticos e de higiene tem aumentado (XU et al., 2017; MOLINA et al., 2020; USMAN et al., 2020). Por exemplo, é o crescente uso de agentes antimicrobianos no tratamento e prevenção de COVID-19, causado pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 (USMAN et al., 2020). Mesmo antes disso, foi previsto que a incidência de fármacos e produtos de higiene em compartimentos ambientais seria preocupante do ponto de vista de desenvolvimento sustentável, uma vez que, atualmente, a qualidade da água já é um grande problema mundial (UNITED NATIONS, 2015).

Nesse contexto, a *Global Water Research Coalition* (GWRC), que é uma organização que propõe diretrizes colaborativas para pesquisas sobre a água e abrange agências ambientais de vários países, como Canadá, Estados Unidos, Austrália, Alemanha, Holanda, França e Reino Unido, classificou alguns fármacos de elevada prioridade para estudos, tais como diclofenaco (DCF) e ibuprofeno (IBU). DCF também foi incluído na lista da “*EU Water Framework Directive*”, a fim de que sejam buscadas medidas preventivas para a inserção do fármaco no ambiente e redução de riscos ambientais. No Reino Unido, DCF e IBU também foram classificados como substâncias prioritárias de estudos para desenvolvimento de tecnologias que os removam de águas residuárias (EUROPEAN COMMISSION, 2012; LONAPPAN et al., 2016). No Brasil também há preocupação em relação a presença desses compostos em águas residuárias e corpos aquáticos. Em 2018, o Setor de Análises Toxicológicas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), iniciou o monitoramento de alguns

micropoluentes emergentes, tais como fármacos anti-inflamatórios, em águas superficiais do Estado de São Paulo para a regulamentação de seus limites máximos (CETESB, 2018).

DCF e IBU são anti-inflamatórios amplamente utilizados para fins humanos e veterinários no tratamento de dor, inflamação e febre (LONAPPAN et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Tais fármacos são de fácil aquisição pela população, uma vez que não precisam de receita médica para a sua venda.

De acordo com a *Intercontinental Marketing Services* (IMS), a produção global do IBU é de 15.000 toneladas/ano e para o DCF, é estimado o consumo de 940 toneladas/ano (LONAPPAN et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Mais da metade da massa ingerida desses fármacos é excretada na urina e fezes sem ser metabolizada (RAINSFORD, 2009; PETRIE et al., 2015). Portanto, DCF e IBU tem sido observados em concentrações consideráveis ($\mu\text{g L}^{-1}$) em águas superficiais e esgoto sanitário (SANTOS et al., 2013; CAMPANHA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). De acordo com a Comunidade Europeia (COM (2011) 876), para avaliação do padrão de qualidade da água, o valor médio anual de EQS (*evaluation of quality standards*) do DCF é de $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ em águas doce e $0,01\mu\text{g L}^{-1}$ em águas marinhas (EUROPEAN COMMISSION, 2012; LONAPPAN et al., 2016).

Além destes, o fármaco propranolol (PRO) e o bactericida triclosan (TCS) também foram observados em concentrações relevantes ($\mu\text{g L}^{-1}$) em águas residuárias e superficiais (GROS et al., 2010; SUI et al., 2011; STASINAKIS et al., 2013; KOSMA et al., 2014; CAMPANHA et al., 2015). O PRO é um β -bloqueador não seletivo, utilizado para o tratamento de diversas doenças, como arritmia cardíaca, hipertensão, hipertireoidismo, tremores e enxaqueca (SCHURE; DINARDO, 2019). O TCS é um agente antimicrobiano que pode se ligar diretamente à ligase de ácidos graxos e formar complexos ternários estáveis, bloqueando assim as vias biossintéticas de lipídios nas membranas celulares (MCNAMARA et al., 2014; CAREY et al., 2016; HULTMAN et al., 2018). Na Europa e China são produzidas em torno de 1.000 toneladas/ano e 1.220 toneladas/ano de TCS, respectivamente (ANGERER et al., 2010; ZHAO et al., 2013). De acordo com a União Europeia, cerca de 85% do volume total de TCS é utilizado em produtos de cuidados pessoais, 5% em indústrias têxteis e 10% em indústrias de materiais plásticos (ANGERER et al., 2010).

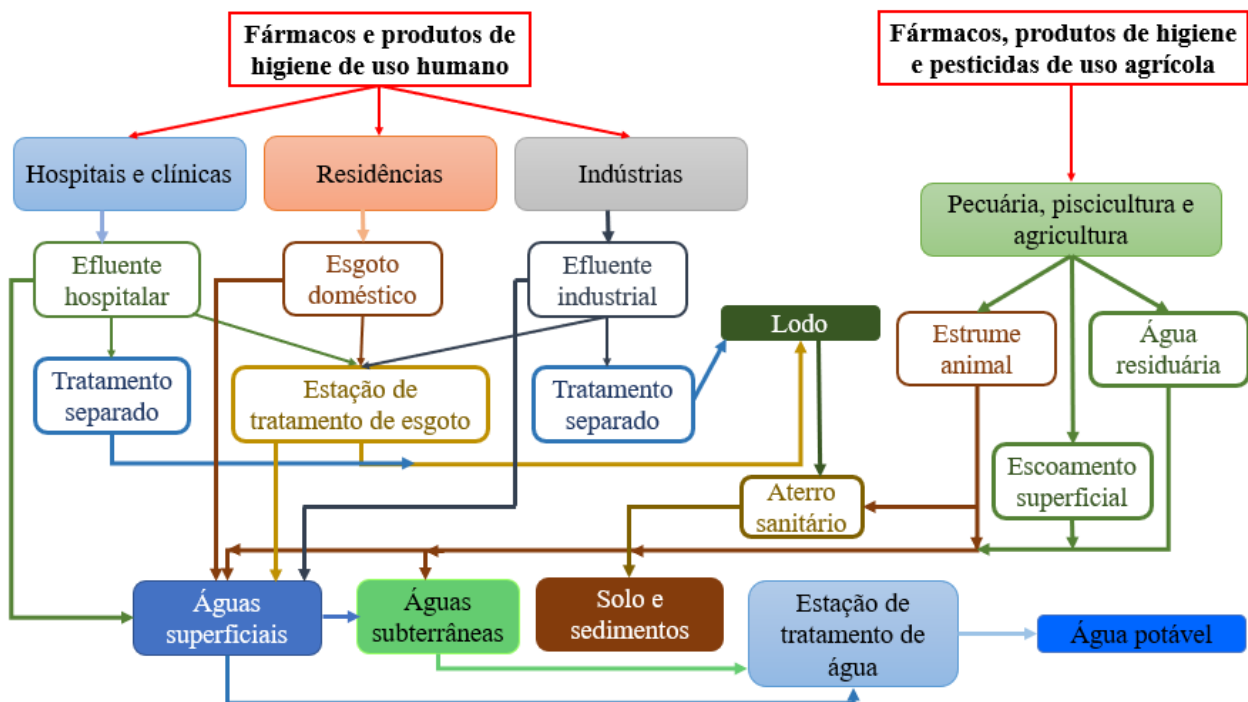
O LAS (*linear alkylbenzene sulfonate*), por sua vez, é um dos surfactantes aniônicos mais utilizado em todo o mundo e está presente, principalmente, em produtos de limpeza doméstico e industrial (BAIN & COMPANY E GAS ENERGY, 2014; BRAGA E VARESCHE, 2014;

ABIPLA/SIPLA, 2017). O Brasil, com produção de 50.000 toneladas/ano é um dos países com maior comércio de produtos de limpeza, atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão (BAIN & COMPANY E GAS ENERGY). Devido a elevada produção e consumo de LAS, tal surfactante acaba disperso em diversos compartimentos ambientais e esgoto sanitário na ordem de mg L^{-1} (CORADA-FERNÁNDEZ et al., 2015; TRAVESO-SOTO et al., 2015; BERGÉ et al., 2017; GRANATTO et al., 2019). Quando presente em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), o LAS pode ocasionar em prejuízos, tais como formação de camadas densas de espuma, que dificultam os processos de aeração, e inibição competitiva na biomassa de lodos ativados (ROSSO; MUDAY; CURRAN, 2018).

2.2. Toxicidade e ocorrência dos micropoluentes emergentes em diferentes matrizes

Os fármacos e produtos de higiene podem atingir as redes coletoras de esgoto por meio de lançamento de águas cinzas (derivadas dos chuveiros, lavatórios e lavanderias), águas negras (excretas de indivíduos) e efluentes industriais (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013). Em relação ao ambiente, existem várias rotas possíveis (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Rota de contaminação de micropoluentes emergentes.



Fonte: Autora.

DCF, IBU, PRO e TCS foram observados em ambiente aquático, incluindo águas superficiais, subterrâneas e marítimas, bem como solos agrícolas, ecossistemas terrestres e até mesmo em áreas pouco exploradas, como a Antártica (ESTEBAN et al., 2016; GONZÁLEZ-ALONSO et al., 2017). As concentrações geralmente observadas desses micropoluentes emergentes, em águas residuárias (Tabela 2.1) e ambiente (Tabela 2.2), são em torno de $\mu\text{g L}^{-1}$. Devido a influência antropogênica, também acabam atingindo áreas naturais protegidas (Tabela 2.3). Para o surfactante LAS, entre 1 a 18 mg L^{-1} são comumente reportadas em esgoto sanitário de diversos países (CAMACHO-MUÑOZ et al., 2014; BERGÉ et al., 2017; GRANATTO et al., 2019). Em demais águas residuárias, como efluente hospitalar e água residuária de lavanderia comercial (ARLC), foram reportados entre 1 a 1.024 mg L^{-1} de LAS (BRAGA E VARESCHE, 2014; BERGÉ et al., 2017).

Tabela 2.1 - Micropoluentes emergentes em esgoto sanitário e águas residuárias.

| | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|---|---|
| Efluente hospitalar | |
| Diclofenaco ^{a,b,c,d} | 0,1 - 1,9 |
| Ibuprofeno ^{a,b,d} | 0,1 - 35,4 |
| Propranolol ^{a,b,d} | 0,08 - 0,2 |
| Triclosan ^d | 26,8 - 74 |
| LAS ^t | 100 - 1.000 |
| Água negra e esgoto sanitário | |
| Diclofenaco ^e | 0,01 - 0,07 |
| Ibuprofeno ^e | 0,10 - 0,30 |
| Propranolol ^e | 0,01 |
| LAS ^s | 8.700 |
| Esgoto sanitário afluente em ETE | |
| Diclofenaco ^{b,f,g,h,i,j,k,l} | 0,01 - 338 |
| Ibuprofeno ^{b,f,h,i,j,l,m} | 0,01 - 10.456 |
| Propranolol ^{b,n,o,l} | 12 - 1.962 |
| Triclosan ^{f,o,p,q} | 0,1 - 239 |
| LAS ^r | 900 - 16.400 |

a: Santos et al., (2013); **b:** Verlicchi et al., (2012); **c:** Sim et al., (2011); **d:** Oliveira et al., (2015); **e:** De Graaff et al., (2011); **f:** Stamatis et al., (2010); **g:** Zhou et al., (2010); **h:** Behera et al., (2011); **i:** Gracia-Lor et al., (2012); **j:** Loos et al., (2013); **k:** Stamatis e Konstantinou, (2013); **l:** Villar-Navarro et al., (2018); **m:** Singer et al., (2010); **n:** Kasprzyk-hordern et al., (2009); **o:** Rosal et al., (2010); **p:** Martin Ruel et al., (2010); **q:** Kumar et al., (2010); **r:** Granatto et al., (2019); **s:** Faria et al., (2017); **t:** Bergé et al., (2017).

Tabela 2.2 - Micropoluentes emergentes em águas superficiais, subterrâneas e solos.

| Micropoluente | Compartimento ambiental | Concentração |
|--|-------------------------|----------------------------------|
| Diclofenaco ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l} | Águas superficiais | 0,001 - 1,1 µg L ⁻¹ |
| | Águas subterrâneas | 9,7 – 3.050 µg L ⁻¹ |
| Ibuprofeno ^{d,e,f,g,k,,m,n,o,p,q,r,s} | Águas superficiais | 0,001 - 1,4 µg L ⁻¹ |
| | Águas subterrâneas | 3 - 395 µg L ⁻¹ |
| | Solo | 0,32 µg g ⁻¹ |
| Triclosan ^{a,c,e,f,k,l,m,p,r,s,t} | Águas superficiais | 0,001 - 1,02 µg L ⁻¹ |
| | Águas subterrâneas | 0,002 - 0,12 µg L ⁻¹ |
| | Solo | 0,002 - 0,02 µg g ⁻¹ |
| Propranolol ^{u,v} | Águas superficiais | 0,01 - 0,12 µg L ⁻¹ |
| LAS ^{x,z} | Águas superficiais | 100 – 250.000 µg L ⁻¹ |

a: Spongberg et al., (2011); **b:** Vulliet; Cren-Olivé; Grenier-Loustalot, (2011); **c:** Stasinkis et al., (2012); **d:** Stasinkis et al., (2012); **e:** Kasprzyk-Horden; Dinsdale; Guwy, (2009); **f:** Loos et al., (2010); **g:** Vulliet; Cren-Olivé; Grenier-Loustalot, (2011); **h:** Maeng et al., (2010); **i:** Müller et al., (2012); **j:** (Stepien et al., 2013); **k:** (Postigo et al., 2010); **l:** (Teijon et al., 2010); **m:** Kleywegt et al., (2011); **n:** Spongberg et al., (2011); **o:** Lin et al., (2011); **p:** Wang et al., (2011); **q:** Teijon et al., (2010); **r:** Fram and Belitz, (2011); **s:** Karnjanapiboonwong et al., (2011); **t:** Chen et al., (2011); **u:** Bendz et al., (2005); **v:** Roberts and Thomas, (2006); **x:** Yuan et al., (2014); **z:** Mungray; Kumar, (2009).

Tabela 2.3 - Micropoluentes emergentes em águas superficiais sem e com influência antropogênica.

| Composto | Influência no compartimento ambiental | Concentração (µg L ⁻¹) |
|----------------------------|---|------------------------------------|
| Diclofenaco ^{a,b} | Descarga de ETE e efluente hospitalar | 0,002 – 0,01 |
| | Descarga de ETE | 0,003 – 0,03 |
| | Sem influência (área natural protegida) | 0,001 – 0,005 |
| | Descarga de ETE e esgoto não tratado | 0,01 |
| Ibuprofeno ^{a,b} | Descarga de ETE e efluente hospitalar | 0,01 – 0,14 |
| | Descarga de ETE | 0,003 – 0,02 |
| | Sem influência (área natural protegida) | 0,004 – 0,20 |
| | Descarga de ETE e esgoto não tratado | 0,22 |
| Triclosan ^{a,b} | Descarga de ETE e efluente hospitalar | 0,01 |
| | Descarga de ETE | 2 10 ⁻⁵ – 0,01 |
| | Descarga de ETE e esgoto não tratado | 0,1 |
| Propranolol ^b | Descarga de ETE e esgoto não tratado | 0,02 |

a: Baena-Nogueras et al., (2016); **b:** Campanha et al., (2015).

As concentrações de micropoluentes emergentes nos diferentes ambientes tem variações espaciais e temporais devido a diversos fatores, tais como taxa de produção e vendas, metabolismo

(excreção), consumo de água *per capita*, persistência ambiental e eficiência de remoção nas ETE (PETROVIC et al., 2009; JELIC et al., 2012). Entretanto, a descarga direta de águas residuárias no ambiente pode sobrecarregar o corpo receptor com micropoluentes emergentes. Para o LAS, por exemplo, no ponto de lançamento de efluente de ETE e ao longo do corpo d'água receptor, foi observado valores maiores que 250 mg L^{-1} (MUNGRAY; KUMAR, 2009). Mesmo valor de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ do surfactante já pode causar problemas de poluição, como o surgimento de espumas persistentes que formam camada isolante e impedem a troca gasosa entre o corpo d'água e a atmosfera, levando a redução de oxigênio dissolvido (YUAN et al., 2014).

Para DCF, IBU, PRO e TCS, concentrações pontuais da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} também podem ocorrer em esgoto e corpos d'água devido ao despejo de efluentes industriais, hospitalares e até mesmo de esgoto após sistema de tratamento (VAN DER AA et al., 2011; LUO et al., 2014; PETRIE et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Além disso, devido a hidrofobicidade das moléculas, esses micropoluentes emergentes tendem a se concentrar no solo, lodo e sedimento, podendo também ocasionar em concentrações ambientalmente significativas (MOMPELAT et al., 2009; TOHIDI e CAI, 2017; XIE et al., 2019).

Os micropoluentes emergentes podem ser metabolizados e/ou bioacumulados por microrganismos e plantas de consumo animal e humano (MOMPELAT et al., 2009; XIE et al., 2019). Isso pode acarretar em prejuízos à saúde da biota e dos seres humanos, uma vez que fármacos e produtos de higiene são produzidos intencionalmente para provocar efeitos biológicos. Consequentemente, organismos aquáticos e terrestres podem sofrer efeitos adversos em decorrência da exposição contínua a esses compostos biologicamente ativos (GONZALEZ-REY et al., 2012; 2014; VELDHOEN et al. 2014; LEVERRIER-PENNA et al. 2018; PRUD'HOMME et al. 2018). Isso porque, a estrutura química de muitos fármacos e produtos de higiene são semelhantes a compostos de sinalização natural e aleloquímicos, podendo resultar em expressão gênica, bloqueio de receptores da membrana celular ou interrupção do sinal de transdução (GARCÍA-CAMBERO et al., 2015). IBU, por exemplo, pode ser prejudicial à proliferação celular em células embrionárias humanas (LEVERRIER-PENNA et al. 2018). O TCS, pode resultar em desenvolvimento de genes de resistência em bactérias patogênicas e, inclusive, em resistência cruzada a antibióticos (MCNAMARA, LAPARA, e NOVAK 2014; CAREY et al. 2016). Além disso, foi relatado a preocupação do uso de águas residuárias contendo esses micropoluentes emergentes para irrigação de solos agrícolas e jardins, uma vez que podem resultar no surgimento

de cepas de bactérias resistentes a múltiplas drogas e levar ao insucesso no tratamento com antibióticos (CAMARGO et al., 2014; FRANKLIN et al., 2016).

Outros prejuízos dos micropoluentes emergentes estão relacionados ao comportamento e morfologia de organismos aquáticos, bem como a efeitos de nível molecular, como alterações nas rotas bioquímicas e desregulação endócrina (FENT et al., 2006; PRUDEN et al., 2006; MARTIN-DIAZ et al., 2009; RHEE et al., 2013; CHEN et al., 2014). Exposição aos fármacos DCF e PRO (0,1-1 $\mu\text{g L}^{-1}$), por exemplo, acarretaram em efeito deletério na sobrevivência e reprodução de peixes e organismos zooplancônicos e bentônicos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). O TCS provocou estresse oxidativo em peixes e moluscos. Para 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, foram observadas alterações nos níveis e nas atividades de algumas enzimas, que levou ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, as quais podem reagir com macromoléculas e promover danos ao DNA (RIVA et al., 2012; KU et al., 2014).

DCF e IBU também causam estresse oxidativo em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*, quando expostos por 15 dias a 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto separadamente. Neste caso, houve também a indução de vitelogenina, uma proteína presente apenas em fêmeas (GONZALEZ-REY e BEBIANNO, 2012; GONZALEZ-REY et al., 2014). Considerando que a vitelogenina é induzida pela presença de estrogênios, alguns fármacos podem atuar como interferentes endócrinos. Além disso, quando esses organismos testes foram expostos à mistura de DCF e IBU notou-se aumento ainda maior dos níveis de vitelogenina em comparação a exposição individual dos fármacos, evidenciando a potencialização de seus efeitos (GONZALEZ-REY et al., 2014). Borgmann et al., (2007) avaliaram o crescimento do afípo *Hylella azteca* expostos à mistura de IBU, DCF e TCS (0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ cada). Após a exposição aos micropoluente emergentes, tais autores relataram aumento de 17% no percentual de machos. Atrasos na idade de reprodução também foram relatados em algumas gerações de *Daphnia magna* quando expostos ao DCF (DIETRICH et al., 2010). Em relação a concentração letal para 50% dos indivíduos expostos (LC_{50}) de peixes medaka (*Oryzias latipes*), a $\text{LC}_{50} - 96\text{h}$ de PRO, TCS e IBU foi de 11.400 $\mu\text{g L}^{-1}$, 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (KIM et al., 2009).

Os fármacos e produtos de higiene também pode reduzir a diversidade de bactérias e algas e, conseqüentemente, gerar maior tempo necessário para o restabelecimento do ecossistema aquático frente ao episódio de contaminação (CORCOLL et al., 2015). Alterações prejudiciais foram observadas em biofilmes e algas expostos ao TCS, devido a sua ação direta como bactericida (LAWRENCE et al., 2009; RICART et al., 2010). Petersen; Heiaas; Tollefsen, (2014) observaram

inibição no crescimento de algas *Skeletonema pseudocostatum* quando expostas ao TCS (0,05-1 $\mu\text{g L}^{-1}$). O aumento na mortalidade de bactérias, com conseqüente redução na eficiência fotossintética em biofilmes, também foi observado por Ricart et al., (2010) para 0,21 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. A redução na quantidade e qualidade das substâncias poliméricas extracelulares, e decréscimo da capacidade de adesão do biofilme ao substrato, também foi observada por Lubarsky et al., (2012) ao expor biofilmes e algas a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS.

Resíduos de surfactantes também podem ocasionar em graves alterações ao ambiente devido à sua propriedade de diminuir a tensão superficial água/ar, pois muitos organismos aquáticos dependem fundamentalmente desta tensão. O LAS, por exemplo, pode dificultar o crescimento de plantas aquáticas e causar efeitos tóxicos em invertebrados e vertebrados (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010). O solo também pode ser afetado por resíduos de LAS. Segundo Nikpay; Lazik; Krebs, (2015), os tensoativos influenciam na permeabilidade do solo, reduzindo o tamanho de seus poros e, conseqüentemente, afetando sua permeabilidade. Além disso, os surfactantes facilitam a dissipação de poluentes no ambiente por meio da formação de espumas e podem inibir a ação de microrganismos responsáveis pelos processos de depuração natural das águas. A ação prejudicial dos surfactantes deve-se ao fato deles poderem se ligar aos peptídeos, enzimas e ácidos nucleicos, alterando o dobramento da cadeia polipeptídica e a carga superficial de moléculas. Conseqüentemente, surfactantes podem modificar as funções biológicas de proteínas sintetizadas (CSERHÁTI et al., 2002; IVANKOVIĆ e HRENOVIĆ, 2010).

O uso inadequado e excessivo de DCF, combinado com a sensibilidade de abutres ao fármaco foi avaliado, o qual resultou em declínio da população de três espécies na Ásia e no norte da África (NAIDOO et al., 2009; VELEVSKI et al., 2015). A exposição de camundongos a efluente de ETE, contendo fármacos e produtos de higiene, resultou em lesões no fígado e rins dos animais, devido a perturbações no metabolismo de lipídios, nucleotídeos, aminoácidos e energia, bem como desregulação dos processos de transdução de sinal de genes (ZHANG et al., 2013). Isso porque, a mistura desses micropoluentes emergentes, que estão presentes em efluentes de ETE, podem resultar em efeitos sinérgicos (LUO et al., 2014; MOLINA et al., 2020) e, conseqüentemente, ocasionar em sérios efeitos adversos ao ambiente e seres humanos (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Efeitos sinérgicos da mistura de produtos farmacêuticos e de higiene em diferentes organismos.

| Filo | Espécie | Mistura | Biomarcador/efeito |
|-----------------------------|--|--|---|
| Bacteroidetes ^a | <i>Flavobacterium sp.</i> | Psicoestimulante, anti-histamínico, antibiótico, antidiabético | Diminuição das populações bacterianas |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | Psicoestimulante, anti-histamínico, antibiótico, antidiabético | |
| Firmicutes ^b | <i>Paracoccus yeei</i> | Analgésico, antipirético e anti-inflamatório | Suscetibilidade |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | | |
| Proteobacteria ^b | <i>Enterobacter aerogenes</i> | Analgésico, antipirético e anti-inflamatório | Resistência |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | | |
| | <i>Vibrio fischeri</i> | | |
| Rotifera ^d | <i>Plationus patulus</i> | Desinfetantes e anti-inflamatórios | Redução de ovos |
| Chlorophyta ^{e, f} | <i>Chlamydomonas microspiraera</i> | Desinfetantes e antidepressivos | Inibição no crescimento de algas |
| | <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | | |
| | <i>Chlorella ellipsoidea</i> | | |
| | <i>Dunaliella salina</i> | | |
| | <i>Dunaliella parva</i> | | |
| | <i>Scendesmus obliquus</i> | | |
| | <i>Scendesmus quadricauda</i> | | |
| Mollusca ^{f, g} | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | Anti-inflamatórios e reguladores lipídicos | Aumento no nível de peroxidação lipídica, glutatona transferase e metalotioneínas. Dano ao DNA e desestabilização do lisossomo membrana |
| | <i>Dreissena polymorpha</i> | Anti-inflamatórios e reguladores lipídicos | Altos níveis de peroxidação lipídica |
| | <i>Unio tumidus</i> | Desinfetantes e anti-inflamatórios | Níveis elevados de razão lactato/piruvato, lipofuscina, fragmentação do DNA e atividade da caspase-3 |

Tabela 2.4- Continuação.

| | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|---|---|
| Arthropoda ^h | <i>Gammarus pulex</i> | β -bloqueadores, desinfetantes e anti-inflamatórios | Alterações nas concentrações de metabólitos |
| | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | β -bloqueadores e anti-inflamatórios | Produção de ROS e inibição de β -gal (linha celular RTG-2) |
| | <i>Oryzias latipes</i> | Anti-inflamatório não esteróide | Atividade antiviolatória |
| Chordata ^{i, j, k, l} | | Desinfetante e anti-inflamatório | Efeitos no comportamento alimentar e velocidade de natação |
| | <i>Pimephales promelas</i> | β -bloqueadores, desinfetantes e anti-inflamatórios | Efeitos estrogênicos moleculares |
| | <i>Pseudorasbora parva</i> | Desinfetante e antidepressivo | Inibição de atividades enzimáticas |
| | <i>Trematomus bernachii</i> | Desinfetantes e surfactantes não iônicos | Bioacumulação em peixes correlacionando-se negativamente com o tamanho |
| Nematoda ^m | <i>Soil nematode community</i> | β -bloqueadores e anti-inflamatórios | Comunidade amplamente alterada |
| Annelida ⁿ | <i>Eisenia andrei</i> | Desinfetantes | Afetam o crescimento e o desempenho reprodutivo |
| Arthropoda ^o | <i>Culex quinquefasciatus</i> | Anti-inflamatórios e antibióticos | Aumentar o tempo de desenvolvimento das larvas. Alterou o microbioma bacteriano do mosquito |
| Magnoliophyte ^f | <i>Triticum aestivum L.</i> | Analgésico e antipirético | A parte aérea e o alongamento das raízes diminuíram. O sistema defensivo antioxidante nas raízes foi danificado |

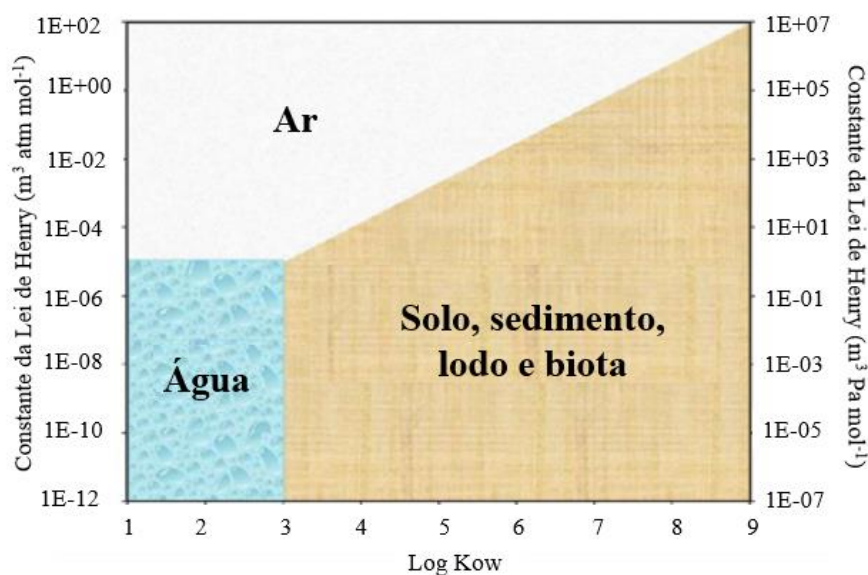
a: Rosi-Marshall et al., (2013); **b:** Bernard et al., (1997); **c:** De García; García-Encina; Irusta-Mata, (2016); **d:** Martinez Gomez; Baca; Walsh, (2015); **e:** Bi et al., (2018); **f:** Quinn et al., (2011); **g:** Falfushynska et al., (2014); **h:** Gómez-Canela et al., (2016); **i:** Fernández; Carbonell; Babín, (2012); **j:** Nassef et al., (2010); **k:** Zenobio et al., (2014); **l:** Emnet et al., (2015); **m:** Gutiérrez et al., (2016); **n:** Chevillot et al., (2018); **o:** Pennington et al., (2015); **p:** An et al., (2009).

Diante do exposto, pode-se observar que DCF, IBU, PRO, TCS e LAS afetam grande variedade de seres vivos, desde os procariontes mais simples, até os eucariotos mais complexos. A ocorrência frequente desses produtos farmacêuticos e de higiene é de grande preocupação devido ao potencial impacto na saúde pública e ambiental. Portanto, trata-se de uma questão emergente buscar alternativas de remoção antes de serem descarregados no ambiente.

2.3. Remoção de Micropoluentes Emergentes

A recalcitrância de micropoluentes em ETE e acúmulo no ambiente estão relacionados a diversos fatores, tais como as diferentes propriedades físico-químicas desses compostos. Dentre as propriedades, os valores do coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), expressos na forma logarítmica ($\log K_{ow}$), estão diretamente relacionados ao ambiente, uma vez que é prevista a acumulação de determinada substância química na água, solo e ar (GHISELLI; JARDIM, 2007). Substâncias que apresentam $\log K_{ow} > 3$ tendem a se acumular no solo, sedimento, lodo e biota, enquanto que as de $\log K_{ow} < 3$ e com constante de Lei de Henry $< 1E-05$ tendem a se distribuir na água (Figura 2.2) (BARESEL et al., 2015).

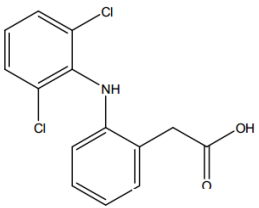
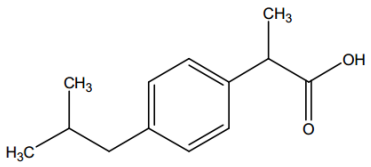
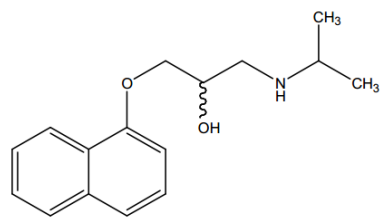
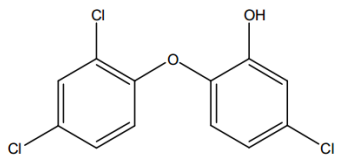
Figura 2.2 - Diagrama de partição generalizado do comportamento de substâncias químicas em função de $\log K_{ow}$.



Fonte: Adaptada de Baresel et al., (2015).

Na Tabela 2.5 estão descritos parâmetros importantes que podem interferir no processo de acumulação ambiental e biodisponibilidade de DCF, IBU, PRO e TCS.

Tabela 2.5 - Características físico-químicas de diclofenaco ibuprofeno, propranolol e triclosan.

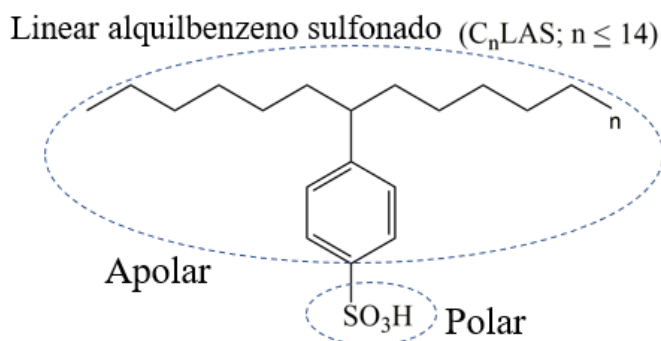
| Composto | Estrutura | Fórmula Molecular | MM (g mol ⁻¹) | DQO teórica (gO ₂ g ⁻¹) | pK _a | Log K _{ow} | Φ _{sat} à 25°C (mg L ⁻¹) |
|-------------|---|---|---------------------------|--|-----------------|---------------------|---|
| Diclofenaco |  | C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ | 296,14 | 1,65 | 4,15 | 4,02 | 2,37 |
| Ibuprofeno |  | C ₁₃ H ₁₈ O ₂ | 206,28 | 2,56 | 4,50 | 3,79 | 21 |
| Propranolol |  | C ₁₆ H ₂₁ NO ₂ | 259,16 | 2,62 | 9,50 | 3,50 | 228 |
| Triclosan |  | C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂ | 289,54 | 1,49 | 7,9 | 4,35 | 10 |

MM: massa molecular; DQO: demanda química de oxigênio; pK_a: constante de acidez; K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água; Φ_{sat}: ponto de saturação.

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> e <http://chemspider.com>

O surfactante LAS é comercializado como uma mistura de isômeros e homólogos. Os isômeros variam em função da posição do anel aromático sulfonado na cadeia alquílica (exceto nos carbonos terminais) e os homólogos variam de acordo com o comprimento da cadeia alquílica (de 10 a 14 átomos de carbono). Em geral, a fórmula molecular dos surfactantes (Figura 2.3) consiste em uma cabeça hidrofílica (que se dissolve na água) e duas caudas hidrofóbicas (grupo de hidrocarboneto não polar), conferindo a capacidade de reduzir a tensão superficial da água. O LAS é um tensoativo aniônico (de carga negativa) e sua molécula contém um anel aromático sulfonado na posição – para, ligado a uma cadeia alquílica linear que pode variar de tamanho (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Molécula de LAS.



Fonte: Autora.

Alguns poluentes recalcitrantes podem ser transformados por processos físicos de adsorção (por exemplo, carvão ativado, grafeno ou nanotubos de carbono) e processos químicos de oxidação avançada (por exemplo, ozonização, tratamento ultravioleta ou irradiação ionizante) (WANG; WANG, 2016). No entanto, a mineralização para o CO₂ nem sempre é alcançada por tais tecnologias avançadas, e os subprodutos gerados durante os processos físico-químicos podem ser ainda mais tóxicos (MARUGÁN et al., 2012; MOLINA et al., 2009; 2020). DCF, IBU, PRO e TCS, por exemplo, mesmo após passarem por sistema de tratamento avançado, foram observados no corpo aquático receptor da ETE de São Carlos-SP (Brasil) (CAMPANHA et al., 2015). Nesta ETE são tratados em média 650 L s⁻¹ de esgoto sanitário com a seguinte concepção: i) Tratamento preliminar; ii) Tratamento biológico: reatores UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*); iii) Tratamento físico-químico: coagulação, floculação e flotação por ar dissolvido; iv) Desinfecção com radiação ultravioleta (UV); v) Pós-aeração/escada hidráulica.

Além disso, utilizar técnicas de remediação biológica têm várias vantagens, como baixo custo e transformação de compostos em substâncias não tóxicas ou mineralização completa (WANG; WANG, 2016; MOLINA et al., 2020). Dessa forma, por meio da degradação microbiana, é possível fornecer alternativa mais segura, ambientalmente favorável e econômica aos métodos físico-químicos para remediação de micropoluentes emergentes (OYA; HISANO, 2010). Portanto, diversos autores destacam a importância de pesquisas no âmbito de desenvolvimento e/ou melhorias de possibilidades para degradação de micropoluentes emergentes, devido aos benefícios associados a elas (DOMARADZKA et al., 2015; TORTELLA et al., 2015; MOLINA et al., 2020).

Nos tratamentos biológicos, os principais mecanismos relatados para remoção de micropoluentes emergentes são degradação/biotransformação e adsorção no lodo (JOSS et al., 2005; JELIC et al., 2011; VERLICCHI et al., 2012). Todavia, a recalcitrância de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS foi relatada (Tabela 2.6 e Tabela 2.7) após passarem por diferentes tratamentos convencionais, tais como lodos ativados e reatores anaeróbios (VON SPERLING, 2016).

Tabela 2.6 - Remoção de micropoluentes emergentes em sistema de lodos ativados.

| Composto | Afluente ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Efluente ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Remoção (%) |
|--|---|---|------------------------|
| Diclofenaco ^{a,b,c,d,e,f,g,h} | $1 \times 10^{-6} - 0,34$ | $1 \times 10^{-6} - 0,21$ | <0-81,4 |
| Ibuprofeno ^{a,cd,e,f,h,i} | $4 \times 10^{-6} - 10,46$ | $1 \times 10^{-6} - 6,50$ | 20-100 |
| Triclosan ^{a,c,f,g,j,k,l} | $3 \times 10^{-5} - 0,02$ | $1 \times 10^{-5} - 0,01$ | 33-99 |
| Propranolol ^{e,j,h} | 0,01 – 2,00 | 0,001 – 0,52 | <0-69 |

a: Stamatis et al., (2010); **b:** Zhou et al., (2010); **c:** Behera et al., (2011); **d:** Gracia-Lor et al., (2012); **e:** Verlicchi et al., (2012); **f:** Loos et al., (2013); **g:** Stamatis e Konstantinou, (2013); **h:** Villar-Navarro et al., (2018); **i:** Singer et al., (2010); **j:** Rosal et al., (2010); **k:** Martin Ruel et al., (2010); **l:** Kumar et al., (2010).

Tabela 2.7 - Remoção de micropoluentes emergentes em reatores anaeróbios.

| Composto | Afluente ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Efluente ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Remoção (%) | Referência |
|-----------------|---|---|------------------------|-------------------------------|
| | 30-40 | 26-35 | 15 | Villar-navarro et al., (2018) |
| | 0,025 | - | <20 | Alvarino et al., (2014) |
| Ibuprofeno | 29,2-132,8 | 3-6 | 6-32 | Butkovskyi et al., (2015) |
| | 147 | 181 | -23 | De Graaff et al., (2011) |
| | 10 | - | 25-80 | Bueno; botella; rico, (2018) |
| | 1-2 | 1-2 | 7 | Butkovskyi et al., (2015) |
| | 0,012 | - | <5 | Alvarino et al., (2014) |
| Diclofenaco | 1,4-8,4 | 4-6 | 12-16 | Alvarino et al., (2014) |
| | 10 | - | 30-70 | Bueno; Botella; Rico, (2018) |
| | 13 | 10,1 | 22 | De Graaff et al., (2011) |
| Propranolol | 1-1,5 | 0,1-0,5 | 30 | Villar-navarro et al., (2018) |
| | 1 | 0,1 | - | De Graaff et al., (2011) |
| Triclosan | 10 | - | 98-99 | Bueno; Botella; Rico, (2018) |
| LAS | 73.50-11.110 | 33.20-6.400 | 60 | Granatto et al., (2019) |

Além das propriedades físico-químicas, parâmetros operacionais empregados à reatores biológicos de ETE também podem influenciar na remoção de micropoluentes emergentes. Dentre eles, pode-se citar o tempo de detenção hidráulico (TDH) e tempo de retenção do lodo (TRL). Para compostos de baixo K_d (coeficiente de distribuição água-lodo), por exemplo, a degradação é maior para maiores TDH. Por outro lado, para substâncias de K_d elevado e de baixa degradação, em geral, a remoção é influenciada pelo TRL. Gros et al. (2010) observaram a influência do TDH, K_d e TRL na remoção de compostos degradáveis. Os autores relataram a maior influência do TDH na remoção de compostos degradáveis e de baixo K_d , uma vez que estes compostos ficam preferencialmente na fase dissolvida. Por outro lado, a remoção de substâncias de K_d elevado e baixa degradabilidade é, em geral, mais influenciada pelo TRL. Nesse caso, maiores TRL favorecem maior adsorção de compostos no lodo (GROS et al., 2010).

Dessa forma, a remoção de micropoluentes emergentes é um processo complexo e bastante variável. Não obstante, pesquisas que relacionaram parâmetros operacionais e físico-químicos com a remoção de fármacos e produtos de higiene em ETE são escassas.

2.4. Reator anaeróbio de leito granular expandido

Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), as ETE tradicionais, geralmente, incorporam lagoas de estabilização e lodos ativados. Entretanto, a tendência é a adoção de reator UASB seguido por alguma forma de pós-tratamento (SNIS, 2016; VON SPERLING, 2016). Uma alternativa a esta tecnologia é o reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB - *Expanded Granular Sludge Bed*), que é uma inovação do reator UASB. A configuração do EGSB é caracterizada pela alta relação comprimento-diâmetro, regime de mistura completa, expansão do leito e recirculação do efluente. Tais características permitem diluição e distribuição uniforme do afluente, além de melhorar o contato esgoto-biomassa (CHEN et al., 2011; OKADA et al., 2013). De fato, maior eficiência de remoção de poluentes recalcitrantes, como o LAS, foi observada em reator EGSB, quando comparado ao reator UASB (OKADA et al., 2013). Os reatores foram operados em condições semelhantes: TDH de 24h e alimentados com substrato sintético (solução de sais, bicarbonato de sódio, metanol e etanol) contendo 14 mg L^{-1} de LAS padrão. Foi observada remoção de LAS de 96% e 89% em reator EGSB e UASB, respectivamente (OKADA et al., 2013).

Delforno et al., (2012) avaliaram a remoção de LAS em reator EGSB em escala de bancada (1,2 L), alimentado com LAS padrão (14 mg L^{-1}) e substrato sintético (solução de sais, bicarbonato de sódio, metanol e etanol), para TDH de 26h e 32h. Segundo os autores, o TDH influenciou na remoção de LAS (26h: 48% e 32h: 68%), principalmente, devido ao tempo de contato de LAS com a biomassa. Todavia, o aumento de escala de reatores resulta em desafios de controle operacional e, principalmente, para aqueles alimentados com esgoto sanitário (GRANATTO et al., 2019), o que pode acarretar em resultados diferentes aos obtidos com reatores em escala de bancada (SÁNCHEZ et al., 2005).

Em reator EGSB em escala de bancada (1,8 L), Faria et al., (2017) avaliaram a remoção de LAS ($18,8 \text{ mg L}^{-1}$) de ARLC diluída em água de abastecimento e esgoto doméstico (Tabela 2.8). Maior remoção de LAS foi observada quando o EGSB foi alimentado com ARLC diluída em água de abastecimento (77%), em comparação a alimentação do reator com ARLC e esgoto doméstico (55%). Para reator EGSB em escala aumentada (62 L) operado com TDH de 40h, Moura et al., (2019) avaliaram a remoção de LAS de ARLC em esgoto doméstico, a fim de obter concentração afluente de LAS de 5, 19 e 36 mg L^{-1} e de matéria orgânica de 380 a 426 mgDQO L^{-1} . Tais autores reportaram diminuição da eficiência de remoção de matéria orgânica (de 61% para 44%) e de LAS (de 71% para 32%) para maior fator de diluição da ARLC em esgoto doméstico. Granatto et al., (2019) também avaliaram a remoção de LAS em reator EGSB

em escala aumentada (69 L) (Tabela 2.8). Entretanto, o reator foi operado com TDH de 36h e alimentado com esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP. Tais autores reportaram remoção de LAS (7 mg L^{-1}) e de matéria orgânica (527 mgDQO L^{-1}) de 60% e 77%, respectivamente. Além disso, Granatto et al., (2019) e Moura et al., (2019) compararam a eficiência de remoção de LAS e de matéria orgânica de reatores EGSB em escala aumentada com os de escala de bancada (Tabela 2.8). Tais autores observaram maior instabilidade para os reatores em escala aumentada quando comparado à estudos anteriores em reatores em escala de bancada (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 - Comparação de eficiência de remoção de matéria orgânica e LAS em reatores EGSB em escala de bancada e escala aumentada para diferentes TDH.

| Referências | Delforno et al., (2014) | Faria et al., (2017) | Moura et al., (2019) | Granatto et al., (2019) |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| Alimentação | ARLC + SS | ARLC + ED | ARLC + ED | ES |
| DQO afluente (mg L^{-1}) | 815±73 | 324±47 | 380±138 | 527±233 |
| Remoção de matéria orgânica (%) | 90±4 | 65±10 | 50±15 | 77±28 |
| LAS afluente (mg L^{-1}) | 12±5 | 24±4 | 19±10 | 7,35±3,76 |
| Remoção LAS (%) | 79±17 | 55±18 | 50±15 | 60±30 |
| TDH (h) | 38 | 36 | 42 | 36 |
| Escala (L) | 1,4 | 1,8 | 62 | 69 |

DQO: demanda química de oxigênio; **ARLC:** água residuária de lavanderia comercial; **SS:** substrato sintético; **ED:** esgoto doméstico; **ES:** esgoto sanitário; **TDH:** tempo de detenção hidráulico.

2.5. Cossustratos metabólicos

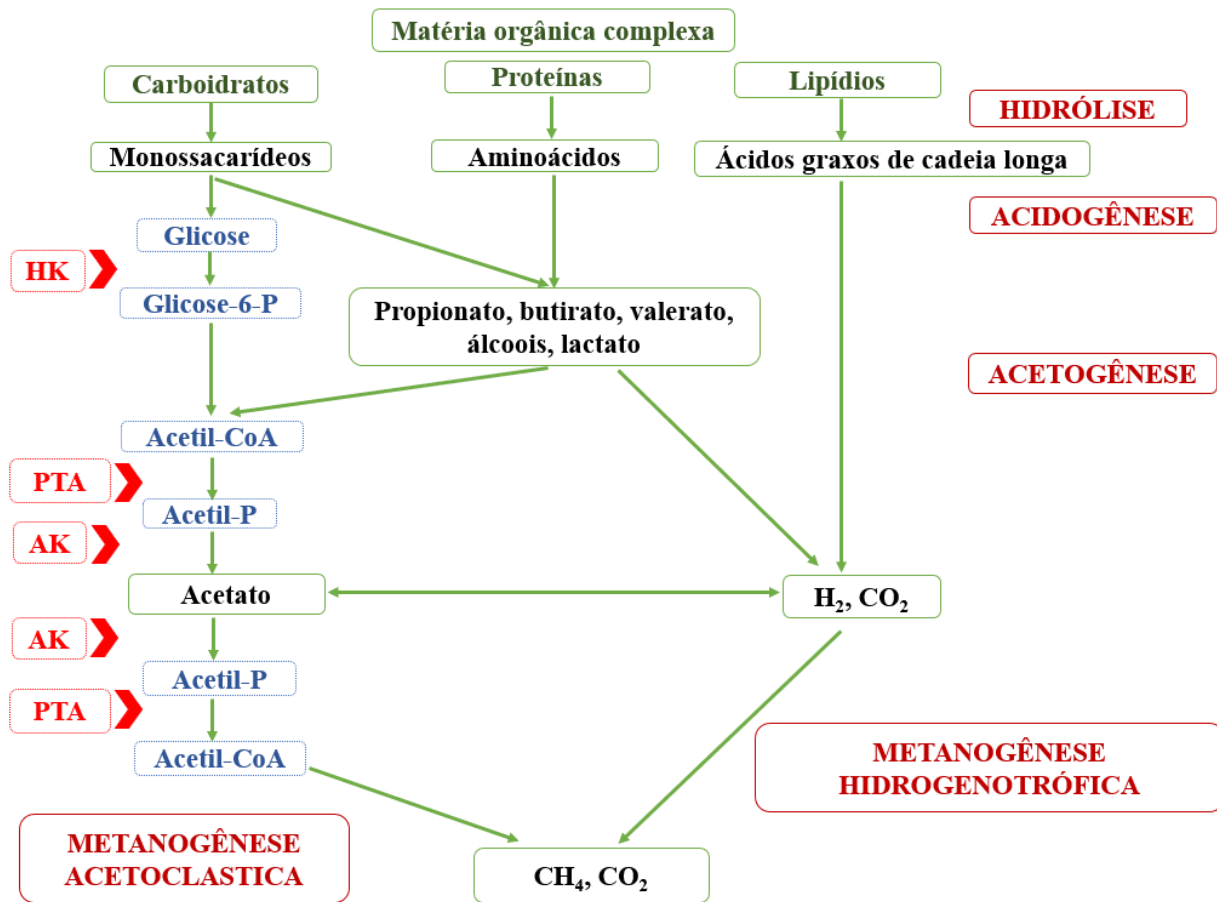
Bactérias aeróbias e anaeróbias possuem diferentes mecanismos para metabolização de compostos, tais como vias de degradação oxidativa, intracelular, extracelular e bioadsorção (absorção e adsorção). Além disso, o efeito sinérgico de atividades enzimáticas de consórcio microbiano pode potencializar a degradação de poluentes recalcitrantes (HA et al., 2016; MOLINA et al., 2020).

No entanto, microrganismos anaeróbios, tais como as arqueias metanogênicas, podem ser componentes-chave para a degradação de poluentes, uma vez que favorecem termodinamicamente

os processos degradativos, atuando como dissipadores de produtos terminais, como H_2 e acetato (KRZMARZICK et al., 2018). Além disso, microrganismos anaeróbios produzem ampla diversidade de enzimas para degradar substratos orgânicos e, dependendo da especificidade, essas enzimas podem modificar a estrutura de poluentes recalcitrantes que não são primordialmente utilizados como substrato de crescimento por outros microrganismos (FISCHER; MAJEWSKY, 2014; KRAH et al., 2016; GONZALEZ-GIL et al., 2017). Por exemplo, os microrganismos podem exibir duas estratégias para metabolismo de micropoluentes emergentes: a mineralização e o cometabolismo, sendo o primeiro processo no qual os microrganismos se desenvolvem utilizando o composto como substrato de crescimento, enquanto o outro o composto é transformado sem que os microrganismos retirem sua energia para se desenvolver (FISCHER; MAJEWSKY, 2014; KRAH et al., 2016; GONZALEZ-GIL et al., 2017). Dessa forma, no cometabolismo, os poluentes recalcitrantes são transformados por atividades enzimáticas extracelulares do consórcio microbiano (FISCHER; MAJEWSKY, 2014; HA et al., 2016; KRAH et al., 2016; GONZALEZ-GIL et al., 2017; MOLINA et al., 2020).

Uma das enzimas responsáveis pela transformação cometabólica de diversos poluentes recalcitrantes é acetato quinase (AK) (GONZALEZ-GIL et al., 2017; 2018; 2019). Tal enzima está envolvida na última etapa da acetogênese em bactérias fermentativas (desfosforilação de acetil fosfato em acetato) e também catalisa a transferência de ATP para acetato (fosforilação do acetato em acetil-fosfato), sendo uma enzima chave na produção de metano (Figura 2.4) (SCHOMBURG et al., 2017). Foi demonstrado que AK pode transformar moléculas de impedimento esférico e que dificilmente são assimiladas por microrganismos anaeróbios (GONZALEZ-GIL et al., 2017; 2019). Para estes casos, a adição de nutrientes específicos pode favorecer as atividades de transformação cometabólica de poluentes recalcitrantes (GONZALEZ-GIL et al., 2017; 2019).

Figura 2.4 - Representação esquemática das etapas da digestão anaeróbia, incluindo os papéis das enzimas hexoquinase (HK), acetato cinase (AK) e fosfotransacetilase (PTA).



Fonte: Autora.

Por exemplo, Macedo et al., (2015) observaram inibição do consórcio microbiano de reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) em escala de bancada (1,6 L) alimentado com ARLC com LAS (20 mg L⁻¹) e operado em TDH de 18h (Tabela 2.9). Entretanto, tais autores relataram que a adição de 80 mg L⁻¹ de etanol na alimentação do reator favoreceu maior eficiência de remoção do surfactante (de 51% para 73%). Motteran et al. (2018) observaram comportamento semelhante em RALF (18,8 L) com TDH de 16h e alimentado com 7, 19, 25 e 43 mg L⁻¹ de LAS de ARLC. Tais autores relataram que embora o LAS (43 mg L⁻¹) tenha exercido efeito tóxico sobre a comunidade microbiana, sua toxicidade foi reduzida quando foi utilizado etanol (200 mg L⁻¹) na alimentação do reator (Tabela 2.9). Em reatores em bateladas, Macedo et al., (2019) avaliaram a influência de etanol (100 mg L⁻¹) na cinética de degradação de LAS. Tais autores observaram que tal cossustrato teve efeito positivo na degradação do LAS para concentração superior a 14,4 mg L⁻¹ do surfactante.

Dessa forma, o uso de etanol e metanol em reatores anaeróbios pode resultar em maior remoção de compostos de difícil degradação por favorecer o processo de produção de metano (GONZALEZ-GIL et al., 2017; 2019). A partir da metabolização de etanol, por populações de bactérias fermentativas, pode-se levar a produção de acetato, o qual será usado por *Methanosaeta*, enquanto metanol pode ser diretamente utilizado por *Methanosarcina* e, conseqüentemente, favorecer as atividades enzimáticas de tais arqueias e a remoção de poluentes recalcitrantes (GUO et al., 2015; GONZALEZ-GIL et al., 2017; 2019).

Microrganismos pertencentes ao gênero *Methanosaeta*, principais produtores de metano em consórcio anaeróbio, tem como primeiro passo da metanogênese a fosforilação do acetato para acetil-fosfato por meio da enzima AK (GUO et al., 2015). Gonzalez-Gil, Carballa e Lema, (2017) investigaram os mecanismos de transformação de 20 micropoluentes emergentes durante a metanogênese com foco no papel dessa enzima AK. Os autores realizaram ensaios com reatores metanogênicos (TDH de 10h) em escala de bancada (14 L), alimentados com AOV (ácidos acético, butírico e propiônico) como cossustratos e também ensaios enzimáticos *in vitro* para inferir sobre o papel da AK na transformação de IBU, DCF, TCS, galaxolida, naproxeno, nonilfenol, octilfenol e bisfenol (50-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ cada). Tais autores relataram que a AK tem papel determinante na transformação de compostos que contêm grupo carboxila ou hidroxila, como DCF, IBU e TCS, pois foram transformados por fosforilação (remoção de 30-50%).

Em outro estudo sobre a metanogênese e remoção de compostos recalcitrantes, Veetil et al., (2012) avaliaram a remoção de TCS (10 mg L^{-1}) em reatores em bateladas alimentados com 50 mg L^{-1} de nitrato (condição desnitrificante), 50 mg L^{-1} de sulfato (condição redutora de sulfato) e 50 mg L^{-1} de acetato (condição metanogênica). Os autores relataram maior degradação de TCS em condição metanogênica (87%), quando comparado a condição desnitrificante (~80%) e redutora de sulfato (~70%). A utilização de fumarato, como cossustrato, também pode favorecer energeticamente a degradação anaeróbia dos compostos aromáticos LAS, DCF, IBU, PRO e TCS, pois em uma das vias anaeróbias para quebra de hidrocarbonetos aromáticos há adição e regeneração de fumarato (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011). Motteran et al., (2020) avaliaram a influência de acetato, formiato e fumarato na remoção de LAS em reatores em bateladas (Tabela 2.9). Os autores relataram que dentre os cossustratos testados, o fumarato favoreceu maior degradação de LAS, sendo de 98% para 26 mg L^{-1} do surfactante (MOTTERAN et al., 2020).

Diversas pesquisas foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da EESC-USP, acerca da degradação de compostos recalcitrantes em reatores em bateladas, RALF e EGSB

(Macedo et al., 2015; 2019; 2020; Moura et al., 2019; Motteran et al., 2018; 2020; Dornelles et al., 2020; Granatto et al., 2017; 2018; 2019; 2020). Em todas estas pesquisas, verificou-se remoção de contaminantes em codigestão com cossustratos metabólicos no esgoto doméstico ou ARLC, as quais podem ser verificadas na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 - Resumo dos trabalhos mais recentes realizados no LPB para remoção de micropoluentes emergentes.

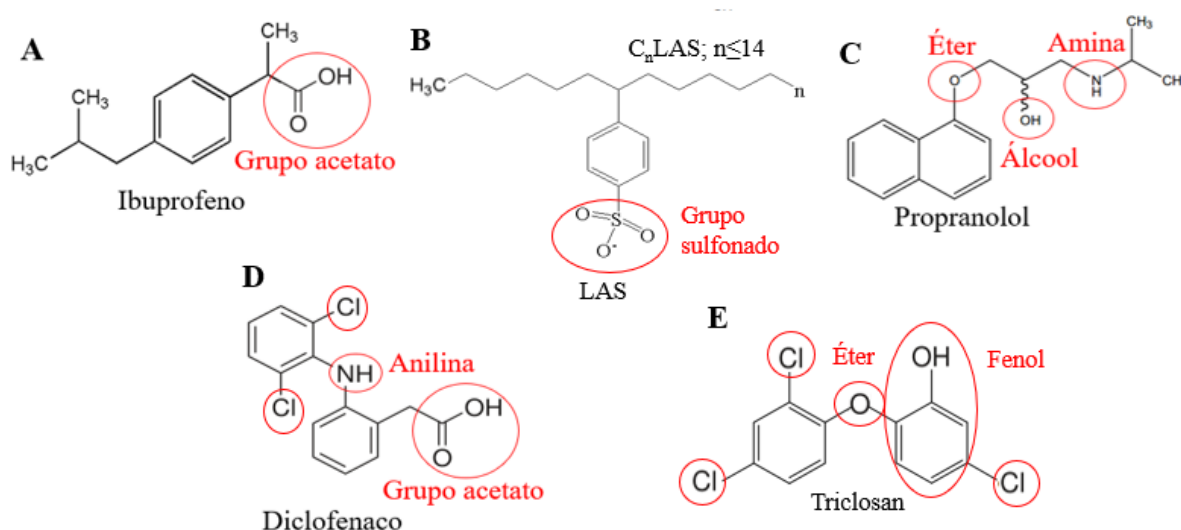
| Reator | Escala | Condição nutricional | TDH | ME afluente | Remoção | Referência |
|-----------|-----------|---|-----|----------------------------|---------|--------------------------|
| RALF | Bancada | ARLC + etanol | 18h | 20 mgLAS L ⁻¹ | 73% | Macedo et al., (2015) |
| EGSB | Aumentada | ARLC + esgoto doméstico | 40h | 11 mgLAS L ⁻¹ | 59% | Granatto et al., (2017) |
| | | Esgoto sanitário | 36h | 9 mgLAS L ⁻¹ | 87% | |
| RLF | Aumentada | LAS padrão + substrato sintético + etanol | 18h | 43 mgLAS L ⁻¹ | 56% | Motteran et al., (2018) |
| RLF | Aumentada | Esgoto sanitário | 18h | 7,35 mgLAS L ⁻¹ | 24% | Granatto et al., (2018) |
| EGSB | Aumentada | Esgoto sanitário | 36h | 7,35 mgLAS L ⁻¹ | 60% | Granatto et al., (2019) |
| EGSB | Aumentada | ARLC + esgoto doméstico | 42h | 19 mgLAS L ⁻¹ | 50% | Moura et al., (2019) |
| | | LAS padrão + substrato sintético + acetato | | | 60% | |
| Bateladas | Bancada | LAS padrão + substrato sintético + formiato | - | 25,8 mgLAS L ⁻¹ | 59% | Motteran et al., (2020) |
| | | LAS padrão + substrato sintético + fumarato | | | 75% | |
| RALF | Aumentada | ARLC + esgoto doméstico + etanol | 18h | 23,8 mgLAS L ⁻¹ | 57% | Macedo et al., (2020) |
| RALF | Aumentada | Nonilfenol + etanol + substrato sintético | 18h | 376 µgNF L ⁻¹ | 78% | Dornelles et al., (2020) |
| Bateladas | Bancada | DCF + etanol + esgoto sanitário | - | 43 mgDCF L ⁻¹ | 29% | Granatto et al., (2020a) |
| | | IBU + etanol + esgoto sanitário | - | 43 mgIBU L ⁻¹ | 19% | |
| Bateladas | Bancada | PRO + esgoto sanitário | - | 0,1 mgPRO L ⁻¹ | - | Granatto et al., (2020b) |
| | | TCS + esgoto sanitário | - | 0,1 mgTCS L ⁻¹ | - | |

ME: micropoluente emergente; **EGSB:** *Expanded Granular Sludge Bed*; **RALF:** reator anaeróbico de leito fluidificado; **LAS:** *linear alkylbenzene sulfonate*; **ARLC:** água residuária de lavanderia comercial; **DCF:** diclofenaco; **IBU:** ibuprofeno; **NF:** nonilfenol, **PRO:** propranolol; **TCS:** triclosan.

2.6. Degradação dos micropoluentes emergentes e bactérias envolvidas no processo

Os micropoluentes emergentes de interesse deste estudo são constituídos de anéis aromáticos, mas se diferenciam pelas suas funções orgânicas. O IBU contém um grupo ácido carboxílico ligado em seu anel (Figura 2.5.6-A), enquanto o LAS um grupo sulfonado (Figura 2.5-B). Na estrutura molecular do PRO, há amina, álcool e éter (Figura 2.5-C) e o DCF consiste em dois anéis benzênicos ligados por uma porção anilina, sendo que um anel contém um grupo de acetato, enquanto o outro contém dois átomos de cloro (Figura 2.5-D). O TCS, também é composto por anel aromático halogenado, no entanto é um éter difenílico triclorado, contendo um grupo fenol (Figura 2.5-E).

Figura 2.5 - Estrutura molecular e funções orgânicas de ibuprofeno, LAS, propranolol, diclofenaco e triclosan.



Fonte: Autora.

Tais funções orgânicas, bem como o anel aromático, tornam esses micropoluentes persistentes sob condições anaeróbias (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GHATTAS et al., 2017). Entretanto, nas vias de transformação aeróbia de IBU e DCF, por exemplo, foram observadas reações que também ocorrem em condições anaeróbias, tais como descloração reductiva, descarboxilação, hidroxilação e carboxilação (JEWELL et al., 2016; JIA et al., 2020). Ademais, foi observada degradação de outros compostos aromáticos halogenados sob condições metanogênicas (STAMS et al., 2006; LIANG et al., 2013).

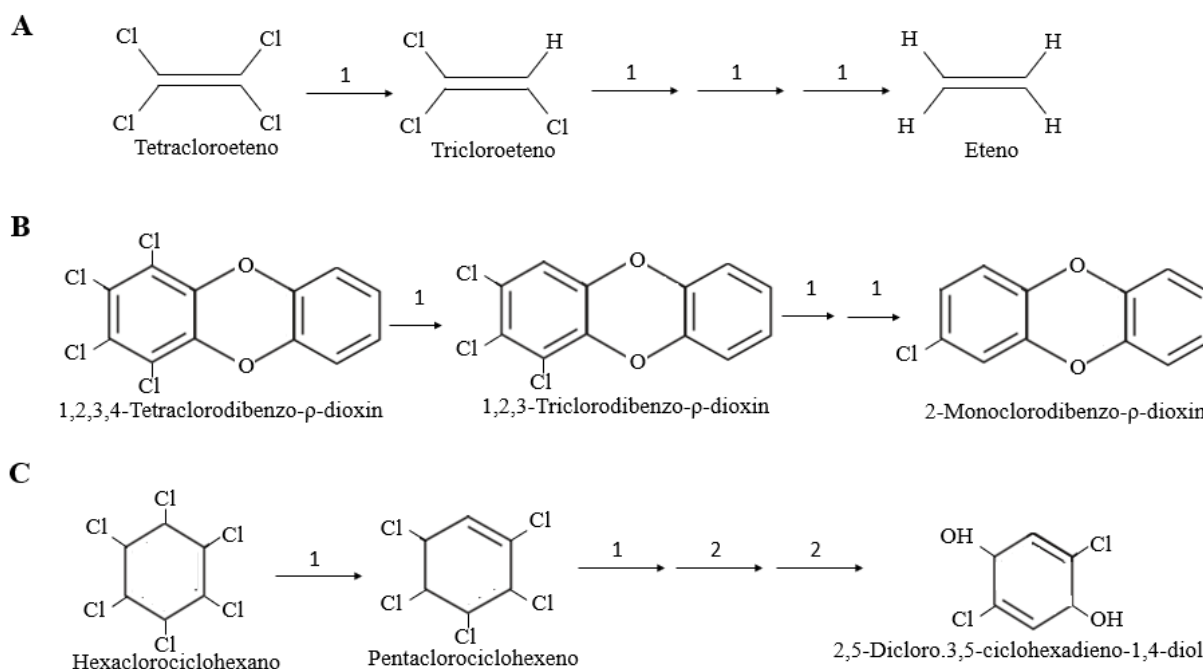
Bactérias halorespirantes participam da degradação de compostos aromáticos halogenados e realizam a descloração redutiva por meio da utilização de halogênios, H₂ e acetato como doadores de elétrons em sistema anaeróbio (DE WEVER et al., 2000; SANFORD; COLE; TIEDJE, 2002; FINNERAN, 2002; LUIJTEN et al., 2004; SMIDT; DE VOS, 2004; STAMS et al., 2006). Exemplo de bactérias halorespirantes são as pertencentes ao Filo Chloroflexi que podem ser enriquecidas em ambientes contendo poluentes clorados (KRZMARZICK et al., 2012; MCNAMARA e KRZMARZICK, 2013).

Outras bactérias, como as semelhantes a *Dehalococcoides* e *Dehalobacter*, que são estritamente anaeróbias (SMIDT; DE VOS, 2004), e *Longilinea*, *Thauera* e *Dechloromonas*, que são anaeróbias facultativas, também foram relacionadas à degradação de compostos aromáticos clorados, tais como diclorofenol (COATES et al., 2001; BRENNER et al., 2005; CHAKRABORTY et al., 2005; LUEDERS et al., 2017). *Mesotoga*, por sua vez, são estritamente anaeróbios e foi relatada a capacidade específica de realizarem transferência horizontal de genes redutores da dehalogenase (enzima essencial para descloração redutiva). Provavelmente, a presença de bactérias semelhantes a esse gênero é essencial para que ocorra a descloração redutiva de organoclorados (ZHAXYBAYEVA et al., 2012), como DCF e TCS, em consórcio microbiano.

Dessa forma, a degradação anaeróbia de TCS e DCF pode ser iniciada por bactérias halorespirantes. Segundo Ghattas et al., (2017), espera-se que o passo inicial da degradação de DCF seja a descloração redutiva, seguida de descarboxilação do fenilacetato. A descloração redutiva também é denominada de desalogenação redutiva ou de desalorespiração. Nesta reação, um átomo de cloro é removido e substituído por um átomo de hidrogênio e ocorre prontamente quando há mais de dois halogênios (Cl, Br, I) na estrutura molecular. Além disso, a reação se torna cada vez mais fácil de ocorrer com o número crescente de halogênios e, principalmente, se estiverem ligados a um sistema de anéis aromáticos (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GHATTAS et al., 2017), como é o caso do DCF e TCS.

Os mecanismos mais comuns de desalogenação são os seguintes: hidrogenólise (Figura 2.6-A), hidrólise (Figura 2.6-B) e combinação de hidrogenólise com hidrólise (Figura 2.6-C) (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GHATTAS et al., 2017). Além desses mecanismos, também foram relatados dihaloeliminação, desalogenação tiolítica por glutathione S-transferase e desalogenação via formação de epóxidos por deslocamento nucleofílico de átomos de halogênio por grupos hidroxí (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GHATTAS et al., 2017).

Figura 2.6 - Desalogenação anaeróbia de compostos polihalogenados via hidrogenólise (1) e hidrólise (2).

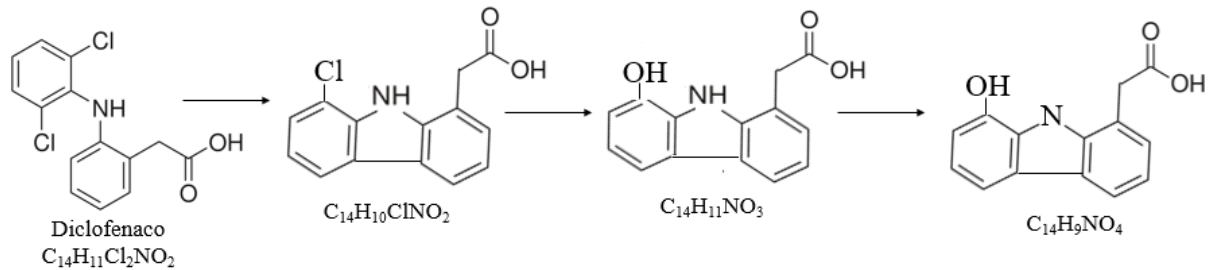


Fonte: Adaptada de Ghattas et al., (2017).

Na ausência de estudos que identificaram subprodutos da degradação anaeróbia de alguns dos micropoluentes de interesse deste estudo, uma ligação pode ser feita entre as etapas de degradação por processos oxidativos. Isso porque, a radiação rompe as ligações mais fracas primeiro, o que também se espera que ocorra inicialmente na digestão anaeróbia, justamente por ligações mais fracas exigirem menos energia dos microrganismos (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GHATTAS et al., 2017; MOLINA et al., 2020).

Para o DCF, alguns produtos intermediários de sua fotólise foram relatados (LEYDY et al., 2019; KEEN et al., 2013). Segundo Leydy et al., (2019), inicialmente, na rota de fotólise do DFC, há perda de um dos cloros e formação de uma ligação carbono-carbono entre os anéis. Posteriormente, ocorre a perda do outro cloro e hidroxilação da espécie (Figura 2.7) (LEYDY et al., 2019).

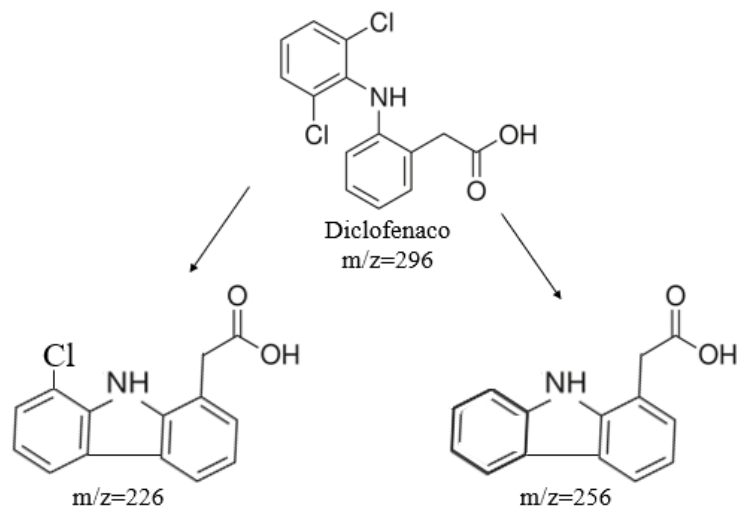
Figura 2.7 - Via de degradação inicial do diclofenaco por fotólise direta proposta por Leydy et al., (2019).



Fonte: Adaptada de Leydy et al., (2019).

Keen et al., (2013) observaram a formação de dímeros quando DFC foi exposto à radiação UV e propuseram uma rota. Segundo os autores, inicialmente também há perda de um cloro para posterior perda do segundo cloro (Figura 2.8).

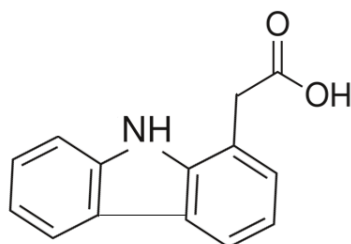
Figura 2.8 - Via de formação de dímeros, a partir de diclofenaco.



Fonte: Adaptada de Keen et al., (2013).

De acordo com os produtos intermediários da transformação de DCF propostos por Leydy et al., (2019) e Keen et al., (2013), há formação de uma série de compostos nos quais o carbazol é a unidade básica dos subprodutos gerados (Figura 2.9).

Figura 2.9 - Unidade básica dos subprodutos gerados durante a transformação do diclofenaco (carbozol).

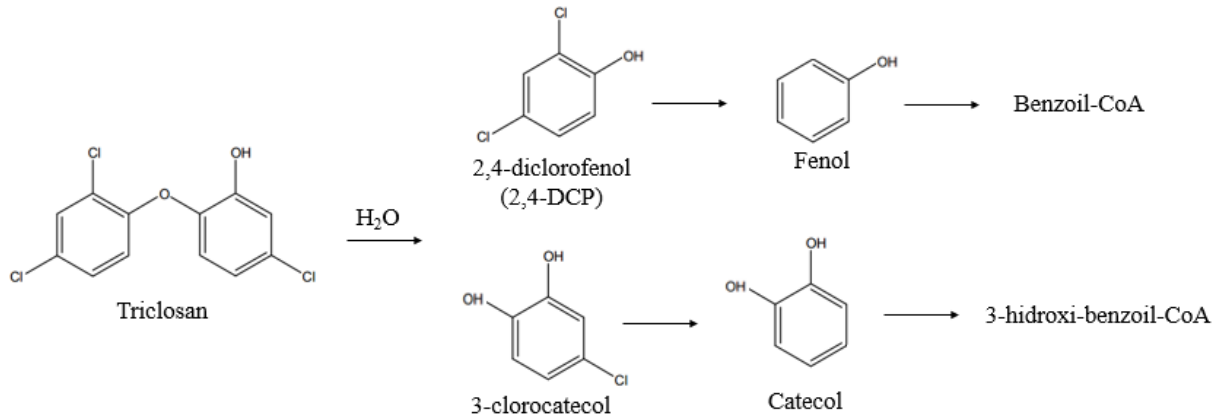


Fonte: Autora.

Em relação ao TCS, está bem documentado que, durante a digestão anaeróbia, o bactericida pode se transformar em clorofenóis, dioxinas, TCS metilado e TCS clorado (BESTER, 2005; BUTH et al., 2010; TOHIDI; CAI, 2017). Entre os microrganismos envolvidos no processo pode-se destacar os pertencentes aos Filos Proteobacteria, Chloroflex e Firmicutes, e gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus thuringiensis*, *Dehalococcoides*, *Anaerolinea*, *Clostridium*, *Sulfobacillus*, *Geobacter* e *Acinetobacter*. Tais microrganismos foram identificados em diversos estudos para identificação de subprodutos formados a partir da degradação anaeróbia de TCS e resistência microbiana ao bactericida (MCNAMARA; KRZMARZICK, 2013; QUANDT et al., 2015; WANG et al., 2018; GONZÁLEZ-BENÍTEZ; MOLINA; ARRAYÁS, 2020; MOLINA et al., 2020).

Como exemplo de alguns outros dos produtos resultantes da degradação de TCS, têm-se 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,8-diclorodibenzoparadióxina (2,8-DCDD) e metiltriclosan (MTCS) (VEETIL et al., (2012). Tais compostos foram identificados por Veetil et al., (2012) durante a degradação anaeróbia de TCS sob condições redutoras de sulfato e, principalmente, sob condições fermentativas-metanogênicas. O TCS foi transformado em 2,4-DCP e clorocatecol por meio de clivagem da ligação éter difenílico e subsequente descloração redutiva, formando catecol e fenol, respectivamente (Figura 2.10). Sabe-se que fenol e catecol são degradados sob condições anaeróbias por meio da ativação da Coenzima A e subsequente redução do anel aromático; ou seja, tais produtos intermediários entram no metabolismo de síntese de ATP. As dioxigenases e a monooxigenase são possivelmente as principais enzimas envolvidas na decomposição geral desses compostos (VEETIL et al., 2012).

Figura 2.10 - Via de degradação do triclosan em condições anaeróbias.



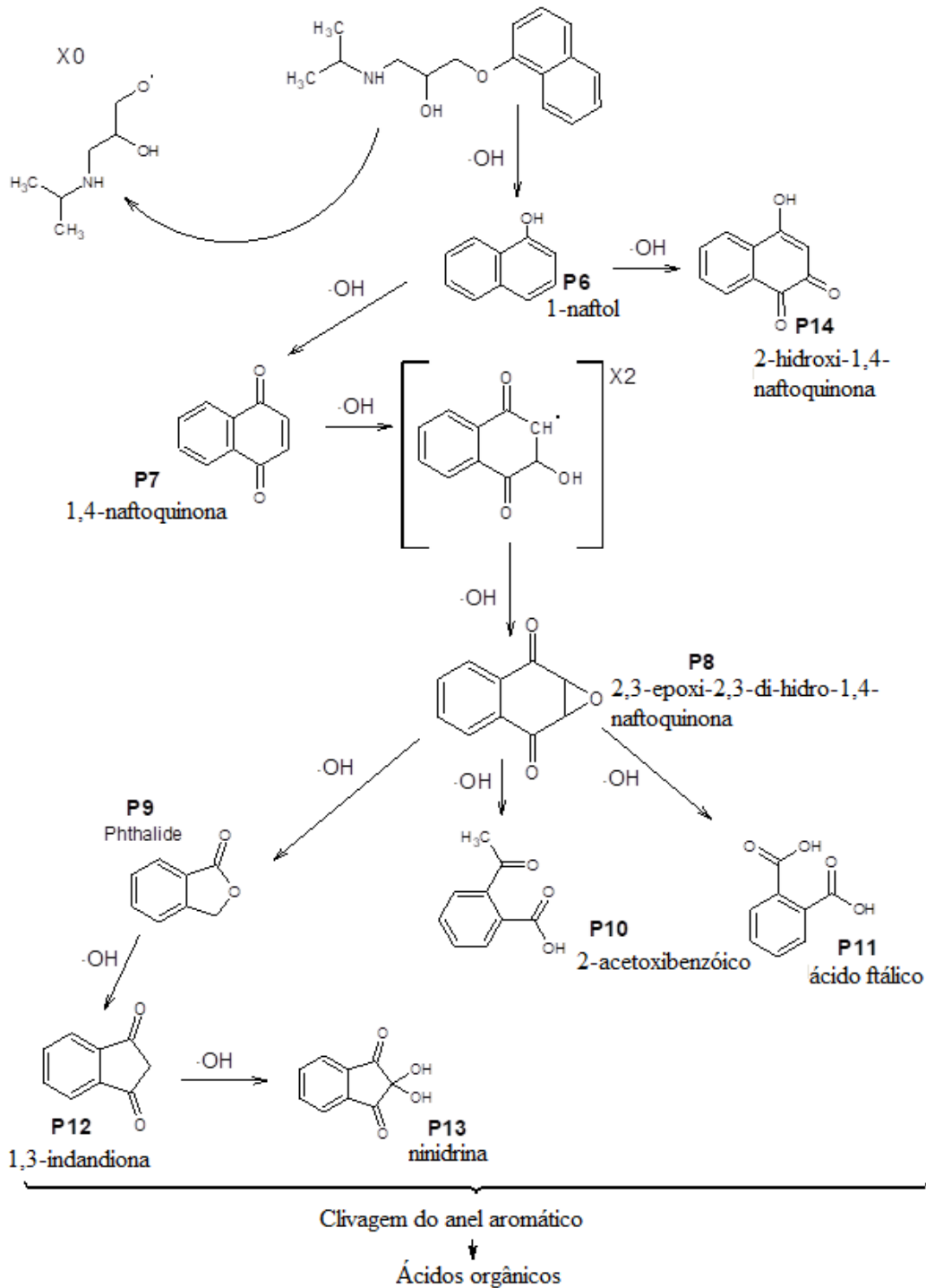
Fonte: Adaptada de Veetil et al., (2012).

Em relação ao PRO, García-Espinoza e Mijaylova Nacheva (2019) propuseram a sua rota de degradação via oxidação eletroquímica. O PRO contém dois locais reativos a oxidação, a saber: a porção aromática e a cadeia lateral; sendo que os agentes reativos primordiais são os radicais produzidos pela oxidação da água ou dos íons halogênicos. No primeiro passo da rota proposta por García-Espinoza e Mijaylova Nacheva (2019) (Figura 2.11), os radicais atacam a ligação C5 da estrutura cíclica dupla de PRO com a liberação da cadeia lateral, gerando 1-naftol (P6) que, por interação radical, se transforma em 1,4-naftoquinona (P7). O P7 lidera a formação do radical X2 que produz um epóxido 2,3-epoxi-2,3-di-hidro-1,4-naftoquinona (P8) via hidroxilação que, por sua vez, resulta em três compostos a partir da quebra do éter cíclico do epóxido P8: i) ftaletos (P9), ii) 2-acetoxibenzoico (P10) e iii) ácido ftálico (P11), com ruptura da estrutura cíclica de dois destes três compostos. Posteriormente, a partir de ftaletos (P9), 1,3-indandiona (P12) e ninidrina (P13) são gerados por hidroxilação. Por outro lado, a partir de 1,4-naftoquinona (P6), é gerado o subproduto 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (P14). Estes subprodutos, bem como a cadeia orgânica rompida do composto original, são transformados em ácidos orgânicos (GARCÍA-ESPINOZA; MIJAYLOVA NACHEVA, 2019).

Em poucos estudos foi investigado e relacionado a comunidade microbiana anaeróbia com a degradação de PRO. Mas, de forma geral, a maioria das bactérias relacionadas a degradação de desregulador endócrino, como o PRO, é pertencente aos Filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Chloroflexi (MOLINA et al., 2020). Gallardo-Altamirano et al., (2019) relataram que a comunidade bacteriana foi dominada por membros dos Filos Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes e Chloroflexi em estudo sobre a diversidade

microbiana e dinâmica populacional da remoção anaeróbia de fármacos (dentre eles PRO). Em relação as arqueias, tais autores relataram dominância de representantes do Filo Euryarchaeota e gêneros *Metanolina*, *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*.

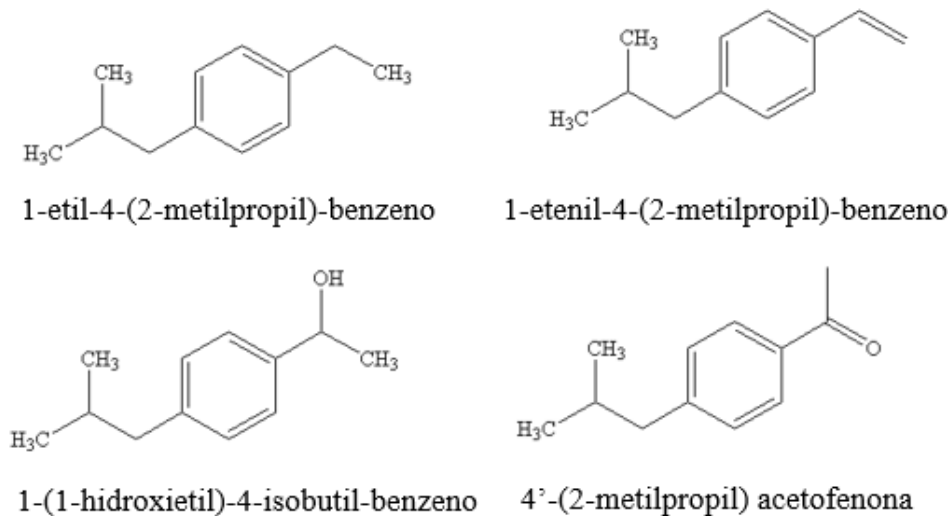
Figura 2.11 - Via de oxidação eletroquímica do propranolol.



Fonte: Adaptada de García-Espinoza & Mijaylova Nacheva, (2019).

Para o IBU, alguns subprodutos de sua degradação (Figura 2.12) via fototólise foram identificados por Szabó et al., (2011). A cadeia alquil do IBU pode ser encurtada por meio de ω e β -oxidação para posterior formação de um grupo de fenilacetato. Este mesmo mecanismo foi relatado para outros compostos que também contém cadeia alquil ligada a anel aromático, como o LAS, por exemplo (LARA-MARTÍN et al. 2010; MOTTERAN et al. 2018). Posteriormente, pode ocorrer a descarboxilação do composto, como confirmado por Szabó et al., (2011). Jia et al., (2020) sugeriram a influência de bactérias redutoras de sulfato (BRS) na remoção de IBU, em especial as pertencentes ao gênero *Desulfobacter*, as quais foram enriquecidas em reator anaeróbio após exposição contínua (180 dias) ao fármaco ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Além disso, Jia et al., (2020) relataram que membros do Filo Chloroflexi e Família Anaerolineaceae são tolerantes a IBU.

Figura 2.12 - Subprodutos da degradação de ibuprofeno por foto-transformação.

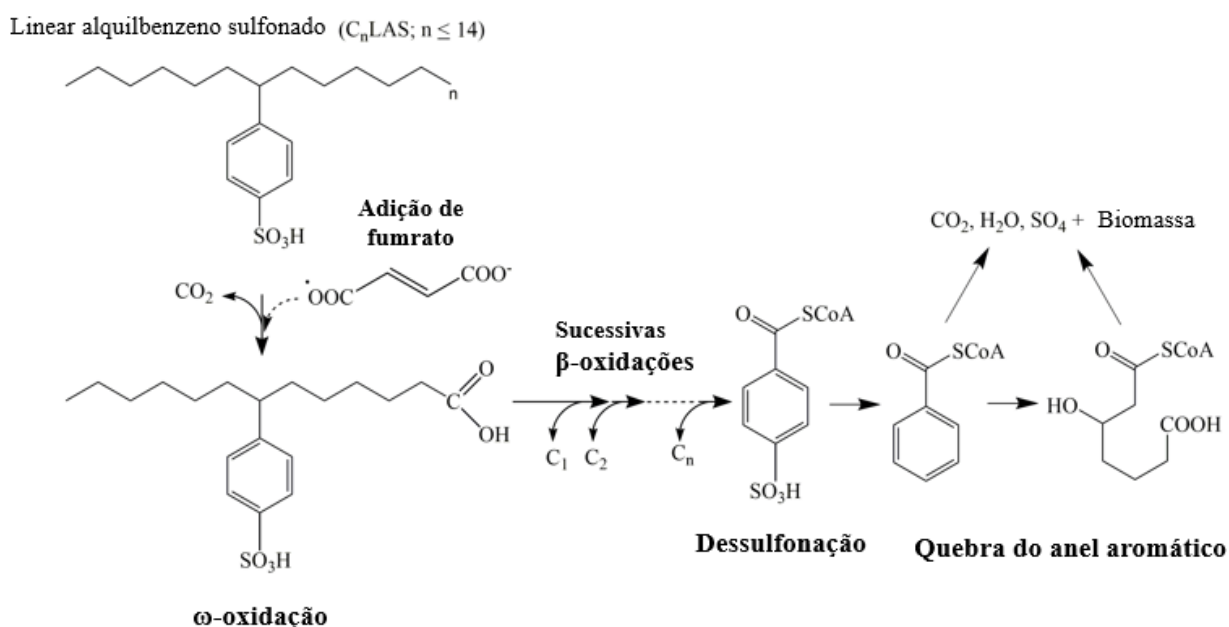


Fonte: Adaptada de Szabó et al., (2011).

Lara-Martín et al., (2010) propuseram a rota de degradação de LAS em sedimentos marinhos sob condições anóxicas e anaeróbias (Figura 2.13). Tais autores mencionam a influência de BRS na degradação desse surfactante em ambientes reduzidos, nos quais a cadeia alquil é encurtada por meio de β -oxidação com o auxílio de adição e regeneração de fumarato. No final do processo, é formado o benzoil-CoA para posterior clivagem do anel aromático. A partir da metatranscriptômica para determinação de genes e taxonomias associadas a

degradação anaeróbia do LAS foi relatado forte potencial genético desta degradação para *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* e *Syntrophobacte*, uma vez que realizam ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e clivagem de anéis aromáticos (CENTURION et al., 2018; DELFORNO et al., 2019; 2020).

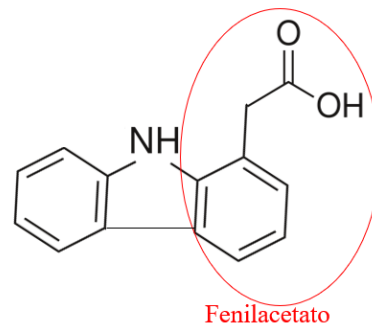
Figura 2.13 - Rota da degradação anaeróbia de LAS.



Fonte: Adaptada de Lara-Martín et al., (2010).

Portanto, diante do exposto, após os passos iniciais para a degradação de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS, estes podem ser seguidos pela clivagem de anel aromático. A degradação anaeróbia de anéis aromáticos ocorre por meio da ativação da Coenzima-CoA, para posterior redução do anel e formação de acetil-CoA (FUCHS, BOLL; HEIDER 2011; GHATTAS et al., 2017). Para o DCF, por exemplo, após a descloração reductiva, sua degradação anaeróbia pode ser prosseguida pela descarboxilação do fenilacetato (Figura 2.14) (GHATTAS et al., 2017).

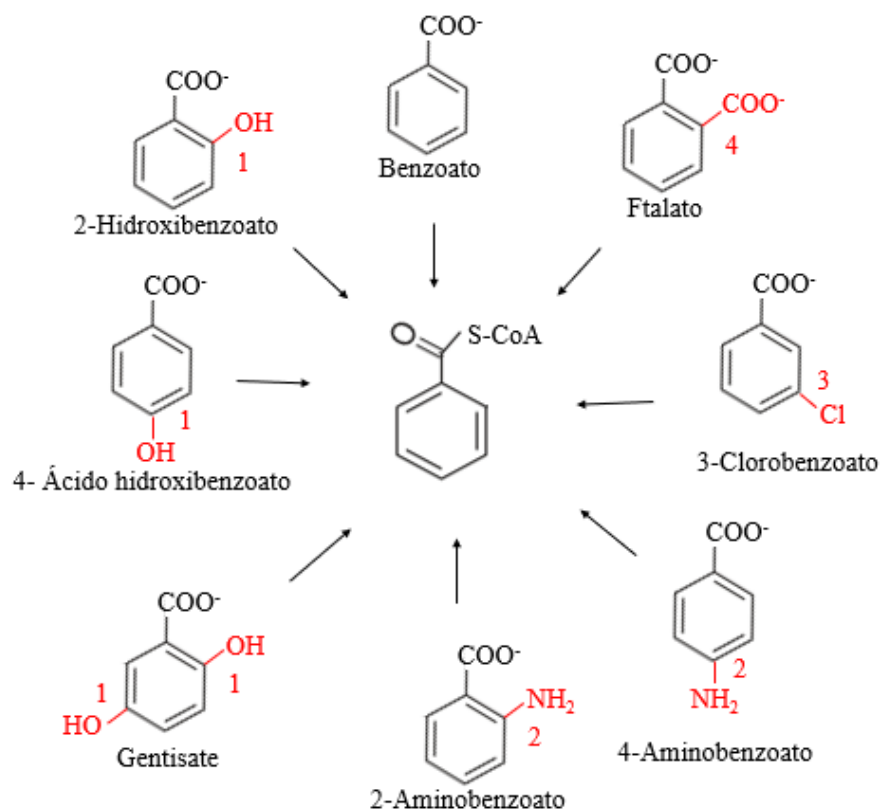
Figura 2.14 - Fenilacetato do diclofenaco.



Fonte: Autora.

O primeiro passo para descarboxilação de ácidos carboxílicos (como o fenilacetato) é a ativação da coenzima A, formando a coenzima A tioéster do ácido carboxílico correspondente. Para que esta etapa inicial ocorra, o anel aromático não pode ser totalmente substituído e um grupo hidroxí (Figura 2.15-1), amino (Figura 2.15-2) ou cloreto (Figura 2.15-3) deve estar presente como substituinte (GIBSON & S. HARWOOD, 2002; CARMONA et al., 2009).

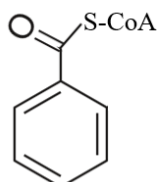
Figura 2.15 - Benzoatos substituídos que podem ser degradados via degradação anaeróbia de benzoil-CoA.



Fonte: Adaptada de Ghattas et al., (2017).

Ácidos fenilcarboxílicos de cadeia mais longa, como fenilacetato e fenilpropionato, podem ser descarboxilados ou desacetilados redutivamente por β -oxidação (HARWOOD et al., 1999). Na ausência de oxigênio, a β -oxidação prossegue como em condições aeróbias e análoga a β -oxidação do benzoil-CoA (Figura 2.16) (WAGENER & SCHINK, 1988; MÖSCHE, 2004).

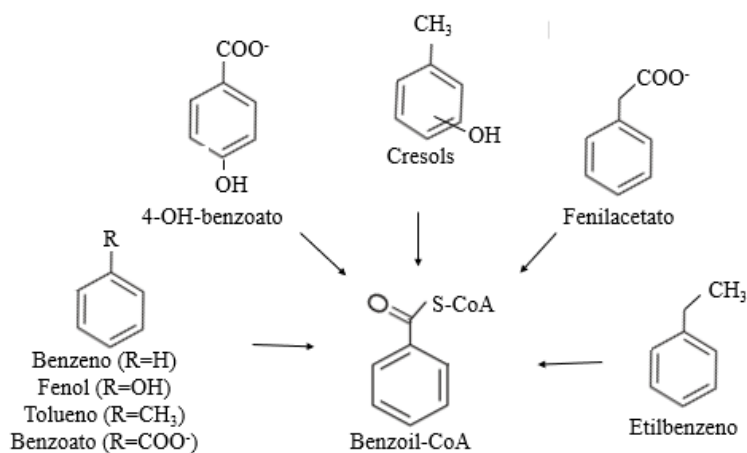
Figura 2.16 - Benzoil-CoA.



Fonte: Autora.

O benzoil-CoA é o intermediário central mais comum na degradação anaeróbia de anéis aromáticos (Figura 2.17), no qual o grupo carboxitioéster atua como o substituinte do elétron (HEIDER; FUCH, 1997; HARWOOD et al., 1999). Isso ocorre porque, na via anaeróbia da degradação de compostos aromáticos, é requerido a redução do anel aromático. Para tanto, são necessários agentes redutores com potenciais redox muito mais negativos que qualquer doador de elétrons fisiológico poderia fornecer (FUCHS; BOLL; HEIDER 2011). No entanto, como alternativa, ocorre a formação de diferentes intermediários centrais, como o benzoil-CoA, que possuem substituintes de maior efeito de retirada de elétrons. Desta forma, a transferência de elétrons para o anel é facilitada (FUCHS; BOLL; HEIDER 2011). O anel benzeno do benzoil-CoA pode ser então desaromatizado por meio da enzima benzoil-CoA redutase em condições redutoras (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GHATTAS et al., 2017).

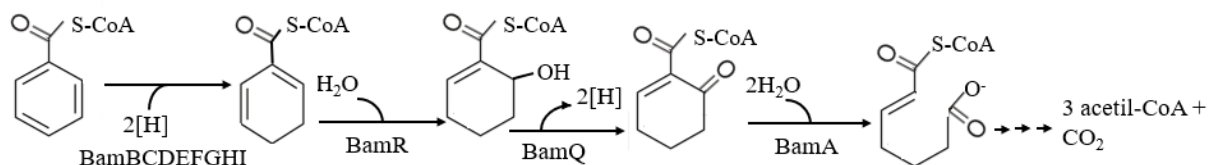
Figura 2.17 - Intermediário central comum na degradação anaeróbia de anéis aromáticos (benzoil-CoA).



Fonte: Adaptada de Fuchs, Boll; Heider (2011).

Segundo Fuchs; Boll e Heider (2011), para microrganismos anaeróbios estritos, a quebra de anéis aromáticos por benzoil-CoA redutases é energeticamente mais favorável do que para anaeróbios facultativos (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011). Além disso, genes codificadores para a enzimas benzoil-CoA redutase (Figura 2.18) foram observados no genoma de vários anaeróbios estritos, como *Geobacter metallireducens*, quando expostos a compostos aromáticos (PETERS et al., 2007; KUNTZE et al., 2008; KUNG et al., 2009). Nesse processo, a energia de ressonância estabilizadora do anel é superada por meio da bifurcação de elétrons (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011). A bifurcação eletrônica é um processo enzimático que pode ser conduzido, por exemplo, pela enzima BamBCDEFGHI (Figura 2.18). Esta enzima pode ser composta por oito diferentes subunidades protéicas, como os co-fatores de Fe-S, tungstênio, zinco, flavina e selenocisteína (WISCHGOLL et al., 2005). Genes que codificam proteínas similares a essas foram identificados em quase todos genomas de bactérias que utilizam o Fe III como receptor final de elétrons (como *Geobacter metallireducens*), que reduzem sulfato (como as BRS), e que são capazes de fermentar substratos que contém compostos aromáticos para o seu crescimento FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; LÖFFLER et al., 2011). Esses genes, como BamBCDEFGH, BamR, BamQ e BamA, codificam enzimas semelhantes ao aldeído, subunidades de transferência de elétrons de hidrogenases, heterodissulfureto redutases e componentes do NADH, como oxidoredutases de quinona (Figura 2.18) (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011).

Figura 2.18 - Degradação anaeróbia de benzoil-CoA pela via independente de ATP. Os nomes de proteínas correspondem a *Geobacter metallireducens*.



Fonte: Adaptada de Fuchs, Boll e Heider (2011).

No entanto, segundo Fuchs; Boll e Heider (2011), o passo crucial para anaeróbios estritos utilizarem compostos aromático como substrato de crescimento é superar a energia que estabiliza a ressonância do anel. Desta forma, o favorecimento de ambiente altamente redutor,

como por exemplo, adicionar cossustratos doadores de elétrons em reatores anaeróbios (como etanol, metanol e fumarato) pode ser uma estratégia para auxiliar na degradação de micropoluentes emergentes que são constituídos de anéis aromáticos, como DCF, IBU, PRO, TCS e LAS.

3. Hipóteses e Objetivos

Os micropoluentes DCF, IBU, PRO, TCS e LAS são recalcitrantes sob condições anaeróbias e algumas populações de bactérias podem degradar esses compostos. Levantou-se a hipótese de que seria possível melhorar a eficiência de remoção anaeróbia de tais micropoluentes emergentes por meio da adição de cossustratos metabólicos. Além disso, alterações no tempo de detenção hidráulico (TDH) do reator EGSB também pode influenciar na remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário.

Dessa forma, as hipóteses levantadas e os objetivos do presente trabalho foram os seguintes:

Hipótese 1: Diferentes concentrações de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário podem influenciar no potencial metanogênico.

Hipótese 2: A adição de cossustratos metabólicos pode favorecer a produção de metano e a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário.

Hipótese 3: Alterações no TDH de operação de reator EGSB podem influenciar na remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário.

Hipótese 4: O emprego de etanol em reator EGSB pode favorecer determinadas populações microbianas em detrimento de outras e melhorar a remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário.

Objetivo geral:

Investigar a remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário sob condições anaeróbias.

Objetivos específicos:

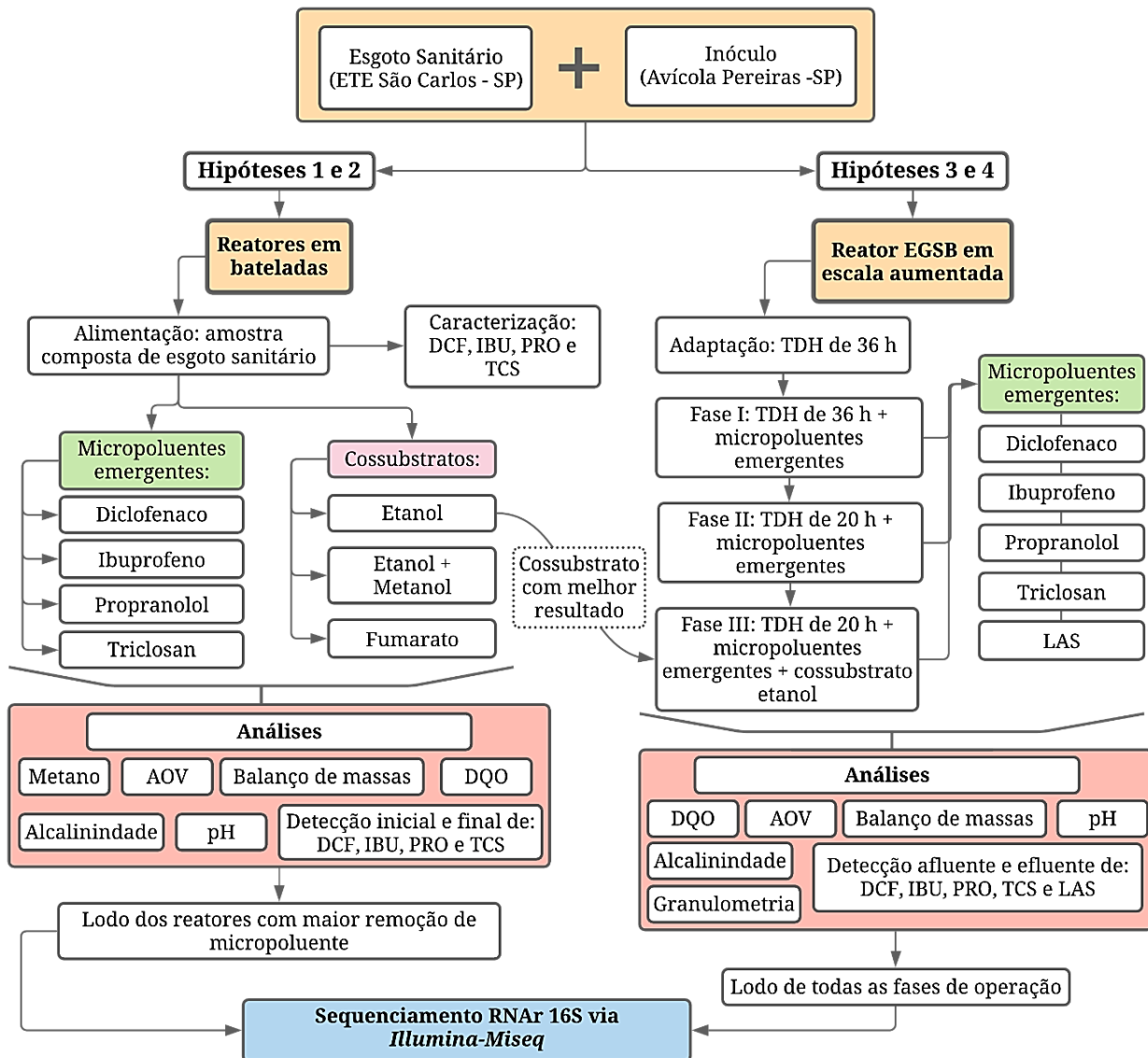
- **Objetivo 1:** Avaliar o potencial metanogênico de lodo granular e a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário submetidos a diferentes concentrações dos compostos em reatores em bateladas.
- **Objetivo 2:** Avaliar o potencial metanogênico de lodo granular e a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário na presença dos cossustratos etanol, metanol e fumarato em reatores em bateladas.
- **Objetivo 3:** Avaliar a remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário empregando diferentes TDH em reator EGSB em escala aumentada.
- **Objetivo 4:** Avaliar a influência do etanol na remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário em reator EGSB em escala aumentada.
- **Objetivo 5:** Caracterizar as populações de bactérias e arqueias dos reatores em batelada de maior remoção de DCF, IBU, PRO e TCS e de todas as fases de operação do reator EGSB em escala aumentada alimentado com esgoto sanitário.

4. Material e Métodos**4.1. Delineamento experimental geral**

Neste estudo, para investigar as hipóteses e atingir os objetivos elencados foi realizado ensaios em reatores em bateladas e em reator EGSB em escala aumentada. Os reatores em bateladas foram operados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) – Campus II. O reator EGSB em escala aumentada foi operado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do município de São Carlos-SP (Brasil).

Na Figura 4.1 é apresentado o delineamento simplificado da execução deste trabalho. Foi utilizado o mesmo inóculo (lodo granular) e a mesma matriz (esgoto sanitário afluyente a ETE de São Carlos-SP) para os reatores em bateladas e reator EGSB em escala aumentada (Figura 4.1). Os ensaios com reatores em bateladas foram realizados para comprovar (ou descartar) as hipóteses 1 e 2; e a operação do EGSB foi realizada para comprovar (ou descartar) as hipóteses 3 e 4 (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Fluxograma experimental.



Fonte: Autora.

ETE: Estação de tratamento de esgoto; EGSB: *Expanded Granular Sludge Bed*; AOV: Ácidos orgânicos voláteis; DQO: Demanda química de oxigênio; LAS: *linear alkylbenzene sulfonate*.

4.2. Micropoluentes emergentes e esgoto Sanitário

Os fármacos DCF, IBU e PRO e o bactericida TCS, usados na alimentação dos reatores em batelada e no reator EGSB em escala aumentada, foram provenientes de farmácia de manipulação localizada na cidade de Araraquara-SP (Brasil).

O esgoto sanitário utilizado para alimentação dos reatores em bateladas e do reator EGSB em escala aumentada foi captado pós-tratamento preliminar (gradeamento grosso, gradeamento fino e desarenação) da ETE de São Carlos-SP.

4.3. Inóculo

O inóculo dos reatores em bateladas e do reator EGSB em escala aumentada foi proveniente de reator UASB de tratamento de água residuária de avícola localizada na cidade de Pereiras-SP (Brasil). Este lodo foi constituído de $52,10 \pm 3,88 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos totais (ST), $10,54 \pm 2,03 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos totais fixos (STF) e $41,55 \pm 3,41 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos totais voláteis (STV).

4.4. Reatores em bateladas

Para a alimentação dos reatores em bateladas, foram preparadas soluções estoques individuais de DCF, IBU, TCS e PRO, em metanol (99,9%), em concentrações finais de $11,7 \text{ g L}^{-1}$, $11,5 \text{ g L}^{-1}$, $5,8 \text{ g L}^{-1}$ e $9,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

Todos os reatores em bateladas foram alimentados com a mesma amostra composta de esgoto sanitário captada por equipamento automático, sendo 20 alíquotas de esgoto em 24 horas diárias por 3 dias consecutivos. Para averiguar a quantidade de DCF, IBU, PRO e TCS presente nessa amostra, foi realizada a caracterização dos compostos conforme metodologia de Campanha et al. (2015) descrita no item 4.6.

Os reatores em batelada foram inoculados com 2 gSTV L^{-1} e esgoto sanitário, totalizando 250 mL de volume reacional e 250 mL de *headspace* preenchido com N_2 (100%). Os reatores foram selados com tampa de butila e rosca plástica, mantidos sob agitação de 100 rpm e climatizados à 30°C . Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos Duran[®] de 500 mL. Antes da inoculação dos reatores em batelada, o lodo de inóculo foi acondicionado sob agitação (100 rpm) e mantido em 30°C até exaurir as fontes de carbono disponíveis.

As condições dos ensaios contendo os anti-inflamatórios DCF e IBU podem ser observadas na Tabela 4.1 e do bactericida TCS e β -bloqueador PRO na Tabela 4.2. A quantidade de etanol (99,9%), metanol (99,9%) e fumarato (99%) adicionados no meio reacional foi baseada na demanda química de oxigênio (DQO) teórica de cada composto (Tabela 4.3).

Tabela 4.1 - Condições operacionais dos ensaios de diclofenaco e ibuprofeno.

| Condição experimental | | DQO (mg L ⁻¹) | Composto (mg L ⁻¹) | Cossustrato (mgDQO L ⁻¹) |
|-----------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------------|---|
| Sem cossustrato | Controle | 563±25 | - | - |
| | D1 | 1.542±30 | DCF (7,11 ±0,02) | - |
| | D2 | 2.309±112 | DCF (13,60±0,03) | - |
| | D3 | 3.399±89 | DCF (26,21±0,04) | - |
| | I1 | 1.477±40 | IBU (6,11±0,01) | - |
| | I2 | 2.309±12 | IBU (11,20±0,01) | - |
| | I3 | 3.903±75 | IBU (26,02±0,05) | - |
| | Com cossustrato | D4 (Controle) | 5.263±25 | DCF (43,10±0,01) |
| DF (Fumarato) | | 5.463±43 | DCF (44,13±0,02) | 200 |
| DE (Etanol) | | 5.463±71 | DCF (43,20±0,01) | 200 |
| DM (Metanol:Etanol) | | 5.463±46 | DCF (44,41±0,05) | 100:100 |
| I4 (Controle) | | 6.293±96 | IBU (43,12±0,03) | - |
| IF (Fumarato) | | 6.436±83 | IBU (42,44±0,02) | 200 |
| IE (Etanol) | | 6.436±74 | IBU (43,42±0,03) | 200 |
| IM (Metanol:Etanol) | | 6.436±57 | IBU (42,61±0,05) | 100:100 |

DQO: demanada química de oxigênio; **DCF:** diclofenaco; **IBU:** ibuprofeno.

Tabela 4.2 - Condições operacionais dos ensaios de triclosan e propranolol.

| Condição experimental | | DQO (mg L ⁻¹) | Composto (mg L ⁻¹) | Cossustrato (mgDQO L ⁻¹) |
|-----------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------------|---|
| Sem cossustrato | Controle | 563±25 | - | - |
| | T1 | 1.075±67 | TCS (3,58±0,08) | - |
| | T2 | 1.109±12 | TCS (5,03±0,06) | - |
| | T3 | 1.581±212 | TCS (15,54±0,03) | - |
| | P1 | 1.044±76 | PRO (6,10±0,15) | - |
| | P2 | 1.173±200 | PRO (15,35±0,21) | - |
| | P3 | 1.556±107 | PRO (28,50±0,54) | - |
| | Com cossustrato | T2 (Controle) | 1.109±12 | TCS (5,03±0,06) |
| TF (Fumarato) | | 1.285±61 | TCS (5,10±0,04) | 200 |
| TE (Etanol) | | 1.290±85 | TCS (5,12±0,71) | 200 |
| TM (Metanol:Etanol) | | 1.283±30 | TCS (5,19±0,53) | 100:100 |
| P4 (Controle) | | 1.915±55 | PRO (55,05±1,30) | - |
| PF (Fumarato) | | 2.107±54 | PRO (55,32±0,91) | 200 |
| PE (Etanol) | | 2.187±41 | PRO (55,84±1,23) | 200 |
| PM (Metanol:Etanol) | | 2.112±39 | PRO (55,78±0,04) | 100:100 |

DQO: demanda química de oxigênio; **TCS:** triclosan; **PRO:** propranolol.

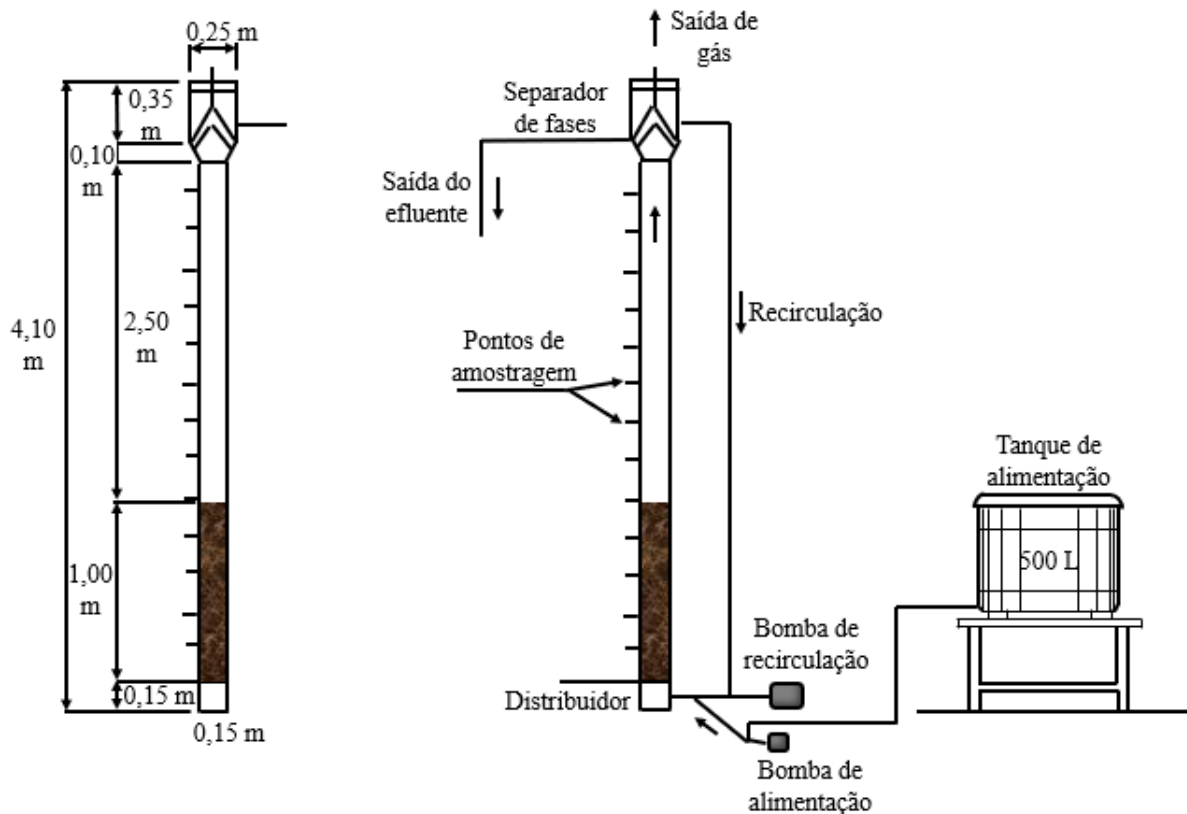
Tabela 4.3 - Relação/fator de equivalência das reações de oxidação completa dos cossubstratos.

| Cossubstrato | Massa molar (g mol ⁻¹) | Reação de oxidação | Fator de equivalência |
|--|------------------------------------|---|-------------------------------|
| Etanol (C ₂ H ₆ O) | 46,07 | $C_2H_6O + 3O_2 \rightarrow 2 CO_2 + 3H_2O$ | 2,09 gDQO gEtOH ⁻¹ |
| Metanol (CH ₄ O) | 32,04 | $CH_4O + \frac{3}{2}O_2 \rightarrow CO_2 + 2H_2O$ | 1,5 gDQO gMetOH ⁻¹ |
| Fumarato (C ₄ H ₂ Na ₂ O ₄) | 160,04 | $C_4H_2Na_2O_4 + 3O_2 \rightarrow 4CO_2 + 2NaOH$ | 0,6 gDQO gFum ⁻¹ |

4.5. Reator EGSB em escala aumentada

O reator EGSB foi construído com as seguintes dimensões: 0,069 m³ de volume, 4,1 m de altura, 15 cm de diâmetro e área de seção de 0,018 m². Ao longo de toda sua extensão foram instalados 12 pontos de amostragem (Figura 4.2). Parte do reator EGSB foi construído em PVC (3,1 m) e outra em acrílico (1 m) para poder visualizar e monitorar a expansão do lodo.

Figura 4.2 - Esquema do Reator EGSB em escala aumentada.



Fonte: Autora.

O reator EGSB foi instalado no laboratório no interior da ETE de São Carlos-SP (SAAE – Serviço Autônomo de Água e Esgoto), localizada à estrada vicinal Cônego Washington José Pêra (22°O1'53.3"S 47°55'37.5"W) (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Laboratório no interior da Estação de Tratamento de Esgoto de São Carlos-SP.



Fonte: Autora.

O reator EGSB foi inoculado com 12 L de lodo granular anaeróbio. A vazão de recirculação do efluente do EGSB (55 L h^{-1}) foi mantida constante durante toda a operação e a temperatura ambiente do local onde o reator estava instalado foi medida no mesmo horário de captação do esgoto sanitário (12h). Para alimentação e recirculação do efluente do reator EGSB, foram utilizadas bombas de diafragma (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Reator EGSB em escala aumentada: (1) Pontos de amostragem (12 Pontos), (2) Parte em PVC (3,1 m), (3) Parte em acrílico (1 m), (4) Lodo adensado, (5) Bomba de recirculação do efluente (diafragma) e (6) Bomba de alimentação (diafragma).



Fonte: Autora.

Para captação do esgoto sanitário utilizado para a alimentação do reator EGSB, foi utilizado uma bomba centrífuga (Figura 4.5-A). O esgoto sanitário foi captado sempre às 12h, e armazenado em uma caixa de 500 L (Figura 4.5-B).

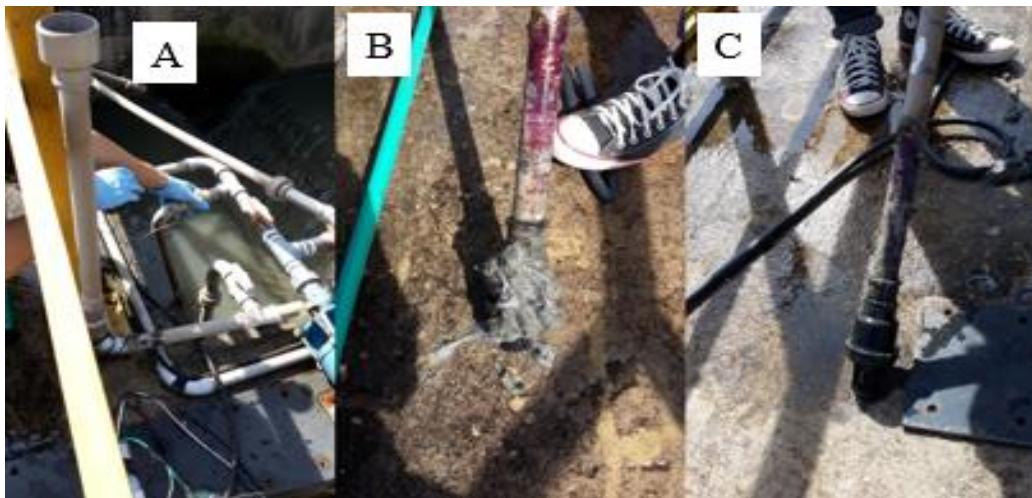
Figura 4.5 - Bomba utilizada para captação do esgoto sanitário pós tratamento preliminar da ETE de São Carlos-SP (A), caixa de 500L utilizada para armazenar o esgoto sanitário afluente ao reator EGSB (B) e caixa completa com esgoto sanitário (C).



Fonte: Autora.

Foi realizada manutenção 2 a 3 vezes por semana da bomba centrífuga que captava o esgoto sanitário para retirada de materiais grosseiros que ficavam presos no pé de crivo (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Retirada do pé de crivo para manutenção (A), sólidos presos no pé de crivo (B) e pé de crivo após a limpeza (C).



Fonte: Autora.

Um protocolo para operação adequada do reator na ETE de São Carlos-SP foi desenvolvido e as informações detalhadas estão descritas no Apêndice.

Para alimentação do reator EGSB, foi preparada uma solução estoque única em metanol (99,9%), em concentração final de 24 g L⁻¹, 36 g L⁻¹, 48 g L⁻¹ e 48 g L⁻¹ de DCF, IBU, TCS e PRO, respectivamente.

A operação do EGSB foi realizada em 4 etapas (Tabela 4.4), diferenciadas pelo TDH e adição do cossustrato etanol. Após a inoculação do reator, iniciou-se a fase de adaptação da biomassa as condições experimentais. Nesta fase, o sistema foi operado em circuito fechado durante 20 dias em TDH de 36±2h e não houve adição dos micropoluentes e cossustrato. Para as outras fases operacionais, foi adicionada 1 mL da solução estoque contendo DCF, IBU, TCS e PRO, à fim de manter as concentrações apresentadas na Tabela 4.5. Tais concentrações foram definidas de acordo a literatura para os micropoluentes em esgoto sanitário e águas residuárias (ROSAL et al., 2010; BEHERA et al., 2011; LOOS et al., 2013; CAMPANHA et al., 2015). A suplementação foi realizada à fim diminuir a flutuação das concentrações de DCF, IBU, TCS e PRO no esgoto sanitário e permitir detecção analítica com maiores precisão e exatidão. O LAS não foi adicionado, pois de acordo com Granatto et al., (2019), este surfactante faz parte do esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP em concentrações consideráveis (mg L⁻¹) no horário determinado (12h) para alimentação do EGSB. A quantidade de etanol (99,9%) foi baseada em sua DQO teórica (Tabela 4.6).

Tabela 4.4 - Fases de operação do reator EGSB.

| Fases | TDH (h) | Temperatura (°C) | Condição nutricional | Duração (dias) |
|--------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Adaptação | 36±2 | 28,0±1,2 | Esgoto sanitário | 20 |
| Fase I | 36±4 | 27,8±3,4 | Esgoto sanitário + ME | 96 |
| Fase II | 20±2 | 21,5±2,2 | Esgoto sanitário + ME | 96 |
| Fase III | 20±3 | 25,7±2,2 | Esgoto sanitário + ME + etanol | 96 |

ME: micropoluentes emergentes diclofenaco, ibuprofeno, propranolol e triclosan

Tabela 4.5 - Concentração dos micropoluentes emergentes adicionados na caixa de alimentação do reator EGSB durante todas as fases de operação.

| Composto | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|-------------|---------------------------------------|
| Diclofenaco | 100 |
| Ibuprofeno | 150 |
| Propranolol | 200 |
| Triclosan | 200 |

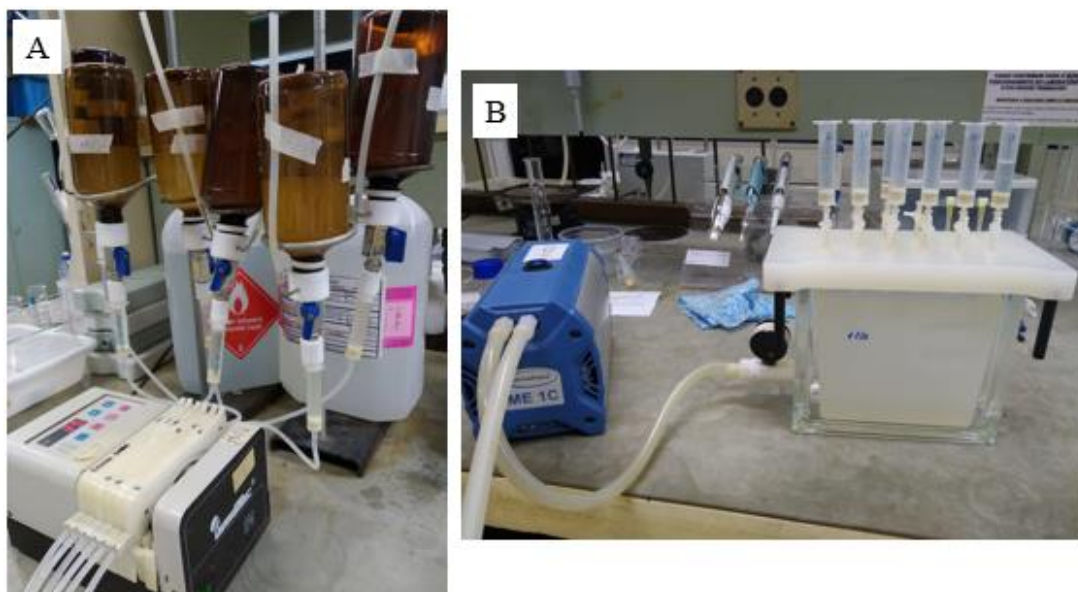
Tabela 4.6 - Relação/fator de equivalência da reação de oxidação completa do cossustrato etanol.

| Cossustrato | Massa molar (g mol^{-1}) | Reação de oxidação | Fator de equivalência |
|---|-------------------------------------|---|-------------------------------|
| Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) | 46,07 | $\text{C}_2\text{H}_6\text{O} + 3\text{O}_2 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ | 2,09 gDQO gEtOH^{-1} |

4.6. Métodos físico-químicos e cromatográficos

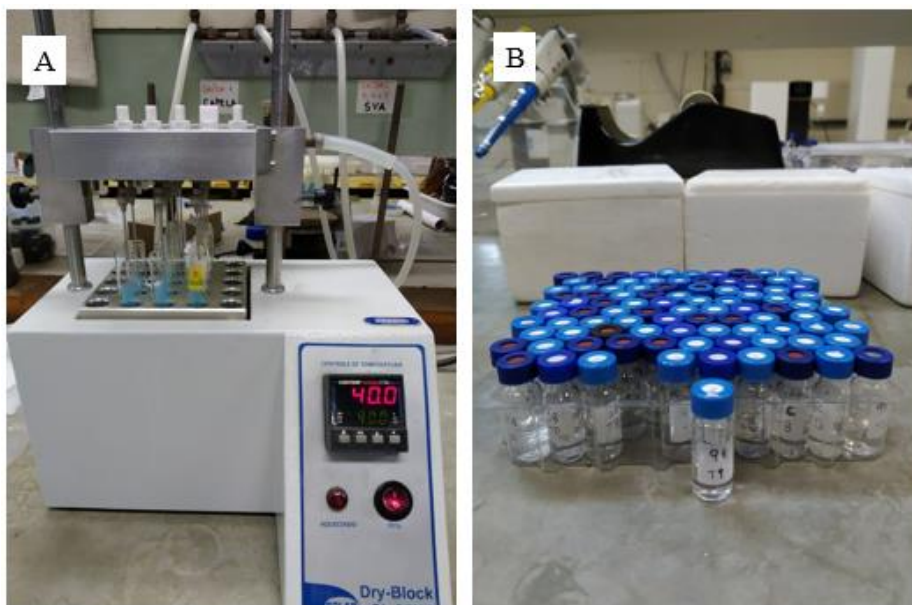
Três litros da amostra composta de esgoto sanitário, utilizada para a alimentação dos reatores em bateladas, foi coletada para a caracterização de DCF, IBU, PRO e TCS. A amostra foi armazenada em garrafa de PET âmbar, previamente lavada com água ultrapura, e transportada a 4°C para o Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (LBGqA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar – São Carlos). Triplicatas de 500 mL da amostra composta do esgoto foram filtradas a vácuo e os compostos-alvos foram extraídos por extração SPE (*solid-phase extraction*) (Figura 4.7). Previamente a extração, uma mistura de compostos marcados isotopicamente foi adicionada as amostras para obter uma concentração final de 100 ng L^{-1} . Os compostos-alvos foram eluídos 2 vezes com 3 mL de metanol (99,9%) seguido de 3 mL de metanol-acetona (99,9%) (50:50, v v⁻¹). Os extratos foram evaporados até à secura sob fluxo de nitrogênio (Figura 4.8) e reconstituídos em metanol-água (25:75, v v⁻¹).

Figura 4.7 – Extração em fase sólida (SPE – *solid-phase extraction*) dos compostos alvos (A) e secagem a vácuo até à secura (B).



Fonte: Autora.

Figura 4.8 – Extratos sendo evaporados até à secura sob corrente de nitrogênio (A) e amostras reconstituídas em metanol-água (B).



Fonte: Autora.

A análise de DCF, IBU, PRO e TCS da caracterização do esgoto, dos reatores em batelada e do reator EGSB foi feita por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS) (CAMPANHA et al., 2015). Para as determinações cromatográficas desses compostos foram usados padrões de alto grau de pureza

(>96%) e procedentes da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Os compostos isotopicamente lábeis foram procedentes da CDN Isotopes (Quebec, Canadá). O metanol e a acetona de grau HPLC foram adquiridos a J.T. Baker (Ecapetec, México) e Mallinkrodt (Phillipsburg, EUA), respectivamente. Ácido fórmico (98%) e hidróxido de amônio de grau HPLC foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Schweiz, Suíça). A água ultrapura foi obtida de um dispositivo Milli-Q (Merck Millipore, São Paulo, Brasil). Os cartuchos utilizados na extração em fase sólida (SPE - *solid-phase extraction*) foram Oasis® HLB (200 mg, 6 mL) comprado da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EUA) (CAMPANHA et al., 2015).

Solução padrão individual de DCF, IBU, PRO e TCS e solução estoque foram preparadas em metanol (grau HPLC) com 100 mg L⁻¹ de cada um, e armazenadas a -18 °C. Antes de cada determinação analítica foram preparadas soluções de trabalho individuais em metanol-água (25:75, v v⁻¹) (CAMPANHA et al., 2015).

Na determinação de DCF, IBU, PRO e TCS por HPLC foi utilizado um sistema Waters ACQUITY UPLC. A UPLC foi equipada com um gerenciador de solventes binários ACQUITY UPLC e um gerenciador de AQUITY UPLC (EUA). A separação cromatográfica foi obtida com uma ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm×2,1 mm, 1,7 µm) precedida de uma coluna de guarda do mesmo material, ambos fornecidos pela Waters (EUA). As fases móveis utilizadas foram solução aquosa a 0,05% de hidróxido de amônio (v v⁻¹) (eluyente A) e metanol (eluyente B), com vazão de 0,45 mL min⁻¹. A coluna e a temperatura da amostra foram de 40 °C e 10 °C, respectivamente. A eluição de gradiente foi iniciada com 5% do eluyente B durante 0,5 min, aumentando para 45% ao longo de 1,5 min, 95% ao longo de 4 minutos, mantido em 95% por 0,5 min e de volta às condições iniciais dentro de 1,5 min. O tempo de execução total foi de 6 min e o volume de injeção foi ajustado para 10 µL (CAMPANHA et al., 2015).

O Espectrômetro de Massa (MS) (TQD, Waters, Reino Unido), utilizado na determinação de DCF, IBU, PRO e TCS, foi equipado com uma fonte de íon eletro-pulverizador (ESI). As análises foram realizadas tanto no modo negativo (NI), quanto no modo de ionização positiva (PI), pois as propriedades físico-químicas dos compostos-alvo são diferentes. Os parâmetros MS foram estabelecidos da seguinte forma: temperatura de dessolvatação de 500 °C; temperatura do bloco fonte ESI de 150 °C; tensão capilar para PI e NI de 3 kV e 2,5 kV, respectivamente; fluxo de gás de nitrogênio de 20 L h⁻¹; fluxo de nitrogênio gasoso de dessolvatação de 750 L h⁻¹; e gás de colisão de argônio de 3×10⁻³ mbar. As análises quantitativas foram realizadas em modo de monitoração de reação múltipla (MRM), em que duas transições entre o íon precursor e o íon de fragmento mais abundante, foram monitoradas para cada analito.

O MRM 1 foi usado para quantificação, enquanto MRM 2 foi usado para fins de confirmação (CAMPANHA et al., 2015).

Para determinação do LAS do reator EGSB em HPLC, foi utilizado padrão (Sigma-Aldrich, CAS 25115-30-0) de alto grau de pureza (99%). Tal composto contém quatro homólogos com 10 – 13 átomos de carbono na cadeia alquílica. O HPLC foi constituído de sistema Shimadzu (SCL10AVP, LC-10ADVP, CTO-10AXL) equipado com bomba LC-10ADVP, válvula FCV-10ALVP, detectores de fluorescência (RF-10 AXL), UV (SPD-M10 AVP), controlador SCL-10AVP e coluna C-8 de fase reversa (Supelco) a uma temperatura de 35°C (DUARTE et al., 2006). A fase móvel inicial consistiu em 90% do solvente A (metanol) e 10% do solvente B (0,075 mol L⁻¹ de NaClO₄ em água ultra pura). Após 25 minutos, diminuiu-se a concentração do solvente A para 20% usando o gradiente de eluição. O fluxo foi mantido em 0,5 mL min⁻¹ e o efluente da coluna foi monitorado por detecção de fluorescência com 225 nm para excitação e 290 nm para emissão (DUARTE et al., 2006).

A análise de ácidos orgânicos voláteis (AOV) dos reatores em bateladas e reator EGSB foi realizada por HPLC para quantificação dos ácidos acético, butírico, capróico, cítrico, fórmico, isobutírico, isovalérico, láctico, málico, propiônico, succínico e valérico. O HPLC foi equipado com: sistema SHIMADZU® HPLC, bomba LC-10ADVP, amostrador automático SIL-20A HT, forno CT-20A, dois detectores conectados em série, sendo um ultravioleta (UV) com arranjo de diodos SDP-M10 AVPmodel e outro RID -10A para índice de refração, e controlador SCL-10AVP. A coluna cromatográfica utilizada foi a AMINEX® HPX-87H (300 mm × 7,8 mm da BioRad) e o software utilizado foi o Class-VP (SHIMADZU®) para análise dos resultados (PENTEADO et al., 2013).

A produção de metano dos reatores em bateladas foi monitorada por Cromatógrafo em Fase Gasosa (GC) 2010 (Shimadzu, Japão), equipado com detector de condutividade térmica e coluna Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm). O gás de arraste empregado foi argônio (12 mL min⁻¹), temperatura do injetor de 220 °C, temperatura da coluna de 130 °C, temperatura do detector de 230 °C e volume de amostra de 500 µL.

As análises físico-químicas e cromatográficas realizadas para os reatores em batelada e reator EGSB em escala aumentada, bem como suas frequências, estão apresentadas na Tabela 4.7. As amostras para análise de DCF, IBU, PRO e TCS foram armazenadas a 4°C e analisadas em até 15 dias. Para determinação de de AOV e LAS, as amostras foram congeladas a -4°C e também analisadas em até 15 dias.

Tabela 4.7 - Frequência e método das análises físico-químicas e cromatográficas realizadas para os reatores em bateladas e reator EGSB em escala aumentada.

| Reator | Análises | Frequência | Método |
|-----------|---------------------------|---------------------|-------------------------|
| Bateladas | Diclofenaco ¹ | Afluente e efluente | Campanha et al., (2015) |
| | Ibuprofeno ¹ | Afluente e efluente | Campanha et al., (2015) |
| | Propranolol ¹ | Afluente e efluente | Campanha et al., (2015) |
| | Triclosan ¹ | Afluente e efluente | Campanha et al., (2015) |
| | pH ¹ | Afluente e efluente | APHA et al., (2005) |
| | DQO ¹ | Afluente e efluente | APHA et al., (2005) |
| | Alcalinidade ¹ | Afluente e efluente | Ripley et al., (1986) |
| | AOV ¹ | Afluente e efluente | Penteado et al., (2013) |
| | Metano | 2 a 3 vezes por dia | - |
| EGSB | Diclofenaco | 3 vezes por semana | Campanha et al., (2015) |
| | Ibuprofeno | 3 vezes por semana | Campanha et al., (2015) |
| | Propranolol | 3 vezes por semana | Campanha et al., (2015) |
| | Triclosan | 3 vezes por semana | Campanha et al., (2015) |
| | LAS | 3 vezes por semana | Duarte et al., (2006) |
| | Sólidos | 2 vezes por semana | APHA et al., (2005) |
| | pH | 4 vezes por semana | APHA et al., (2005) |
| | DQO | 4 vezes por semana | APHA et al., (2005) |
| | Alcalinidade | 4 vezes por semana | Ripley et al., (1986) |
| | AOV | 3 vezes por semana | Penteado et al., (2013) |

¹ análises realizadas ao início e ao fim das bateladas (efluente e afluente); **AOV**: ácidos orgânicos voláteis.

4.7. Balanço de massa

Para o balanço de massa realizou-se extração dos micropoluentes emergentes adsorvidos no lodo de inóculo, nos lodos ao final dos ensaios dos reatores em bateladas e no lodo do reator EGSB ao final de cada fase de operação. Para a extração de DCF, IBU, PRO e TCS utilizou-se a metodologia descrita por Gago-Ferrero et al., (2015) e para o LAS, a descrita por Duarte et al., (2006).

Para os reatores em bateladas, o balanço de massas foi realizado de acordo com as Equações 1 e 2:

$$X_{\text{rem}} = X_{\text{aflu}} - X_{\text{eflu}} \quad (1)$$

$$X_{\text{deg}} = X_{\text{aflu}} - (X_{\text{eflu}} + X_{\text{ads}}) \quad (2)$$

Sendo: X = massa do micropolvente de interesse; X_{rem} = massa do micropolvente de interesse removido por processos biológicos e físicos; X_{aflu} = massa do micropolvente de interesse no afluente; X_{eflu} = massa do micropolvente de interesse no efluente; X_{biodeg} = massa

do micropolvente de interesse removido por processos biológicos; X_{ads} = massa do micropolvente de interesse adsorvido no lodo.

Para o cálculo da massa dos micropoluentes emergentes que entrou no reator EGSB e que foi recuperada no efluente, utilizou-se a Equação 3:

$$\text{Massa de } X_{(afl/efl)} = [X].Q.T \quad (3)$$

Sendo: Massa de $X_{(afl/efl)}$ = massa do composto de interesse acumulado no afluente/efluente; $[X]$ = concentração do composto de interesse; Q = vazão afluente/efluente ($L h^{-1}$) ao reator EGSB; T = tempo de operação (h) do reator EGSB.

Para o cálculo da massa dos micropoluentes emergentes adsorvidos no lodo do reator EGSB, foi utilizada a Equação 4:

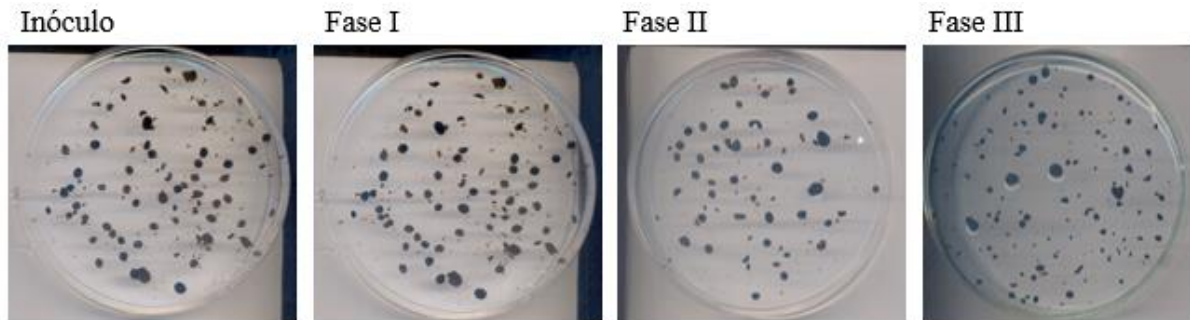
$$X_{adsEGSB} = \alpha.\beta.V \quad (4)$$

Sendo: $X_{adsEGSB}$ = massa do composto de interesse adsorvida no lodo do reator EGSB ao final de cada de operação; α = média da concentração do composto de interesse ($mg gST^{-1}$ ou $\mu g gST^{-1}$) extraída do lodo do EGSB ao final de cada de operação; β = sólidos totais do lodo do reator EGSB ($g L^{-1}$) ao final de cada de fase de operação; V = volume do reator EGSB (L).

4.8. Análise granulométrica

A análise de granulometria do inóculo e do lodo do reator EGSB ao final de cada fase de operação foi realizada por meio de microscópio Olympus BHZT com câmera acoplada para captura de imagem (Figura 4.9). O tratamento de imagens, contagem e medição do diâmetro médio dos grânulos foram feitos conforme a metodologia de Alves et al., (2018).

Figura 4.9 - Granulometria do lodo de inóculo e dos lodos do reator EGSB ao final de cada fase de operação.



Fonte: Autora.

4.9. Caracterização taxonômica

A extração de DNA foi realizada com FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals). Os iniciadores usados para o gene RNAr 16S foram 341F/806R (região V3V4) para o Domínio Bacteria e U519F/806R (região V4) para o Domínio Archaea. A análise de sequências foi realizada via software Uparse (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) (EDGAR, 2013). Sequências com similaridade $\geq 97\%$ foram atribuídas às mesmas unidades taxonômicas operacionais (OTU). A sequência representativa para cada OTU foi rastreada para anotações adicionais. Para cada sequência representativa, o Banco de Dados GreenGene (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (DESANTIS et al., 2006) foi utilizado com base no classificador RDP3 classifier (Version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) (WANG et al., 2007) para anotar informações taxonômicas.

Para estudar a relação taxonômica de diferentes OTU em diferentes amostras (grupos), foi realizado o alinhamento de múltiplas sequências usando o software MUSCLE software (Version 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) (EDGAR, 2013). Todos esses índices foram calculados com QIIME (versão 1.7.0) e exibidos com o software R (versão 2.15.3).

Os dados brutos das sequências foram depositados no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA387459>), com número de acesso descritos na Tabela 4.8.

Informações adicionais da análise de biologia molecular estão descritas no Anexo.

Tabela 4.8 - Número de acesso dos dados de sequenciamento depositados no GenBank.

| Reator | Número de acesso | Nome da amostra | Tax ID | BioProject |
|----------|------------------|-------------------------|--------------|-------------|
| DE | SRX7570849 | dicloethanol_1 | SAMN13852376 | PRJNA670216 |
| | SRR10902676 | dicloethanol_1_1.fq | | |
| IE | SRX7570850 | ibuethanol_2 | SAMN13852377 | |
| | SRR10902675 | ibuethanol_2_1.fq | | |
| P3 | SRX9029214 | PRO40 Arch_1 | | |
| | SRR12539532 | Arch_1.fastq | | |
| | SRX9029215 | PRO40 Bact_1 | | |
| | SRR12539531 | Bact_1.fastq | | |
| TE | SRX9029216 | TCSethanol Arch_2 | SAMN15900611 | |
| | SRR12539530 | TCSethanol Arch_2.fastq | | |
| | SRX9029217 | TCSethanol Bact_2 | | |
| | SRR12539529 | TCSethanol Bact_2.fastq | | |
| EGSB | SRX9345530 | E36B_CG1 | SAMN16486497 | |
| Fase I | SRX9345531 | E36A_CG1 | | |
| EGSB | SRX9345532 | E20B_CG2 | SAMN16486497 | |
| Fase II | SRX9345533 | E20A_CG2 | | |
| EGSB | SRX9345534 | E20EB_CG3 | SAMN16486497 | |
| Fase III | SRX9345535 | E20EA_CG3 | | |

Links: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA387459>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=PRJNA659759>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA670216>

4.10. Análises estatísticas e ajuste ao modelo de Gompertz

Para o reator EGSB, utilizou-se teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar diferenças significativas entre mais de dois conjuntos de dados. Para dois conjuntos de dados, o teste de Mann-Whitney foi utilizado. A hipótese nula (H_0) de medianas iguais dos testes foi descartada quando p -valor $< 0,05$. O intervalo de confiança utilizado foi de 95% para todos os testes estatísticos. Todas as análises estatísticas foram realizadas via software PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Buscando-se identificar os valores do potencial metanogênico (P), velocidade máxima de produção de metano (R_m) e tempo para iniciar a produção de metano (λ), associados a cada condição empregada aos reatores em bateladas, procurou-se ajustar aos pontos experimentais a função modificada de Gompertz (ZWIETERING et al., 1990), utilizando o *software* OriginPro 8.0®. Foram realizadas acima de 100 interações para convergir os dados usando o modelo matemático supracitado. Os equacionamentos empregados para o cálculo dos valores de cada variável resposta referentes a produção de metano estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Equacionamentos empregados para os cálculos das variáveis respostas utilizadas para avaliação dos ensaios em reatores em bateladas.

| Variável resposta | Unidade | Equacionamento | Parâmetros do cálculo |
|---|---|---|--|
| Potencial metanogênico (P) | μmolCH_4 | | |
| Velocidade máxima de produção de metano (Rm) | $\mu\text{molCH}_4 \text{ mL}^{-1}$ | $H = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$ | H = produção acumulada de metano (μmol) t = tempo (horas) e = número de Euler (2,71828) |
| Tempo para iniciar a produção de metano (λ) | horas | | |
| Rendimento de CH_4 (YC) | $\mu\text{molCH}_4 \text{ mgDQO}_{\text{rem}}^{-1}$ | $YC = \frac{VC}{(DQO_{\text{aflu}} - DQO_{\text{eflu}}) \cdot VR}$ | VC = volume de CH_4 (μmol) VR = volume reacionaldo (ml) DQO _{aflu} = concentração de DQO afluente ao reator (mg L^{-1}) DQO _{eflu} = concentração de DQO efluente do reator (mg L^{-1}) DQO _{rem} = DQO removida (mg) |

DQO: demanda química de oxigênio.

5. Resultados e Discussão

5.1. Reatores em bateladas

5.1.1. Caracterização do esgoto sanitário afluyente a ETE de São Carlos-SP

Na amostra composta de esgoto sanitário utilizado para alimentação dos reatores em bateladas foram observadas concentrações máximas de $5,86 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,85 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$ para IBU, DCF, PRO e TCS, respectivamente (Tabela 5.1). De forma geral, notou-se maior concentração de IBU ($5,10 \pm 0,80 \mu\text{g L}^{-1}$), seguido de PRO ($0,82 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$), TCS ($0,51 \pm 0,15 \mu\text{g L}^{-1}$) e DCF ($0,30 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Concentração dos micropoluentes emergentes na amostra composta de esgoto sanitário afluyente a ETE de São Carlos-SP.

| Composto | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Média ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|-------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Ibuprofeno | 4,25 | $5,10 \pm 0,80$ |
| | 5,86 | |
| | 5,17 | |
| Diclofenaco | 0,25 | $0,30 \pm 0,06$ |
| | 0,36 | |
| | 0,27 | |
| Propranolol | 0,80 | $0,82 \pm 0,03$ |
| | 0,81 | |
| | 0,85 | |
| Triclosan | 0,35 | $0,51 \pm 0,15$ |
| | 0,65 | |
| | 0,53 | |

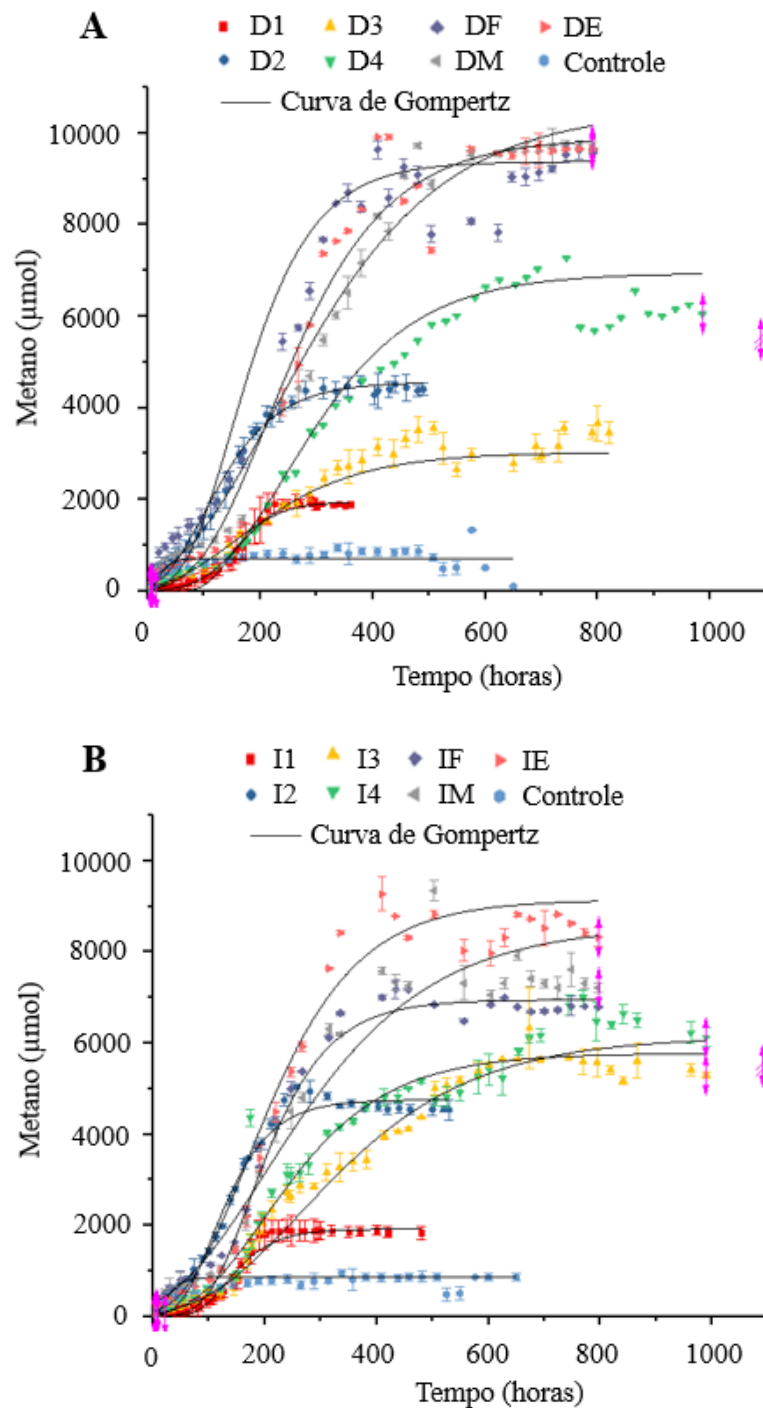
Em esgoto sanitário de outros países, também foi reportado maiores concentrações para IBU ($0,01 - 10.456 \mu\text{g L}^{-1}$), em comparação a DCF ($0,01 - 338 \mu\text{g L}^{-1}$), PRO ($12 - 1.962 \mu\text{g L}^{-1}$) e TCS ($0,1 - 239 \mu\text{g L}^{-1}$) (STAMATIS et al., 2010; GRACIA-LOR et al., 2012; VERLICCHI et al., 2012; VILLAR-NAVARRO et al., 2018). Isso porque, o IBU é um analgésico popular de fácil acesso, sendo o princípio ativo de diversos tipos de medicamentos que podem ser comercializados sem receita médica (LUO et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Na jusante do rio Monjolinho, onde há descarga de esgoto não tratado e do efluente da ETE de São Carlos-SP, Campanha et al., (2015) também observaram maior concentração para IBU ($0,22 \mu\text{g L}^{-1}$), seguido de TCS ($0,10 \mu\text{g L}^{-1}$), PRO ($0,02 \mu\text{g L}^{-1}$) e DCF ($0,01 \mu\text{g L}^{-1}$).

A legislação em vigor no Brasil é a portaria do Ministério da Saúde nº2914/11 (padrões de potabilidade da água), a resolução Conama 357/05 (padrões de classificação de corpos de água) e a resolução Conama 430/11 (lançamento de efluentes). Tais legislações não dispõem de valores limites para resíduos de fármacos, mas para metais, solventes, agrotóxicos, pesticidas e contaminantes microbiológicos. Entretanto, em 2018, o Setor de Análises Toxicológicas da CETESB iniciou o monitoramento de alguns micropoluentes emergentes, tais como fármacos anti-inflamatórios, em águas superficiais do Estado de São Paulo, para a regulamentação de limites máximos desses compostos (CETESB, 2018). Alguns órgãos regulatórios internacionais, como União Europeia (EU), Agência de Proteção Ambiental do Norte da América (USEPA), Organização Mundial de Saúde (WHO) e Programa Internacional de Segurança Química (IPSC), estão publicando emendas para que se conheça o potencial de atividade endócrina de um produto químico antes de ser descarregado no ambiente. Entretanto, a legislação de tais órgãos internacionais também não estabelece limites de concentração para resíduos farmacológicos em corpos de água, somente para solventes, agrotóxicos, pesticidas, metais e materiais radioativos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Apenas para DCF, a Comunidade Europeia dispôs sobre o valor médio anual de EQS (*evaluation of quality standards*) para avaliação do padrão de qualidade da água, sendo de $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ e $0,01\mu\text{g L}^{-1}$ para águas doce e marinha, respectivamente (EUROPEAN COMMISSION, 2012; LONAPPAN et al., 2016).

5.1.2. Potencial metanogênico e remoção de diclofenaco e ibuprofeno

Na ausência de cossustrato, foi observado aumento do potencial metanogênico conforme o aumento das concentrações de DCF e IBU (Figura 5.1). O valor de P do Controle foi de $855\pm 5\mu\text{mol}$, enquanto em D4 e I4 foi de $6.943\pm 121\mu\text{mol}$ e $6.145\pm 101\mu\text{mol}$, respectivamente. Empregando os cossustratos, o potencial metanogênico foi ainda maior (Tabela 5.2). Maiores valores de P foram obtidos para etanol (DE: $11.530\pm 368\mu\text{mol}$; IE: $10.583\pm 512\mu\text{mol}$), seguido de metanol:etanol (DM: $9.897\pm 212\mu\text{mol}$; IM: $8.141\pm 191\mu\text{mol}$) e fumarato (DF: $9.379\pm 259\mu\text{mol}$; IF: $6.947\pm 66.20\mu\text{mol}$).

Figura 5.1 - Produção de metano dos reatores em bateladas contendo diclofenaco (A) e ibuprofeno (B).



Fonte: Autora.

Controle: esgoto sanitário; **D1:** $7,11 \pm 0,02 \text{ mgDCF L}^{-1}$; **D2:** $13,60 \pm 0,03 \text{ mgDCF L}^{-1}$; **D3:** $26,21 \pm 0,04 \text{ mgDCF L}^{-1}$; **D4:** $43,10 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1}$; **DF:** $44,13 \pm 0,02 \text{ mgDCF L}^{-1}$ + Fumarato*; **DE:** $43,20 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1}$ + Etanol*; **DM:** $44,41 \pm 0,05 \text{ mgDCF L}^{-1}$ + Metanol:Etanol*; **I1:** $6,11 \pm 0,01 \text{ mgIBU L}^{-1}$; **I2:** $11,20 \pm 0,01 \text{ mgIBU L}^{-1}$; **I3:** $26,02 \pm 0,05 \text{ mgIBU L}^{-1}$; **I4:** $43,12 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1}$; **IF:** $42,44 \pm 0,02 \text{ mgIBU L}^{-1}$ + Fumarato*; **IE:** $43,42 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1}$ + Etanol*; **IM:** $42,61 \pm 0,05 \text{ mgIBU L}^{-1}$ + Metanol:Etanol*; * 200 mgDQO L^{-1} ; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Tabela 5.2 - Parâmetros de Gompertz de potencial metanogênico para os reatores com diclofenaco e ibuprofeno.

| | <i>P</i> (μmol) | <i>λ</i> (h) | <i>Rm</i> (μmol h ⁻¹) | <i>R</i> ² |
|----------------------|-----------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Controle | 855±5 | 6±1 | 20±3 | 99 |
| Diclofenaco | | | | |
| D1 | 1.948±29 | 18±2 | 16±1 | 99 |
| D2 | 4.559±32 | 27±3 | 23±1 | 99 |
| D3 | 3.025±81 | 36±6 | 9±1 | 98 |
| D4 (Controle) | 6.943±121 | 118±4 | 20±1 | 99 |
| DF (fumarato*) | 9.379±259 | 90±5 | 32±4 | 97 |
| DE (etanol*) | 11.530±368 | 52±4 | 43±1 | 98 |
| DM (metanol:etanol*) | 9.897±212 | 66±8 | 38±2 | 99 |
| Ibuprofeno | | | | |
| I1 | 1.915±35 | 20±4 | 14±1 | 98 |
| I2 | 4.753±86 | 49±5 | 15±2 | 99 |
| I3 | 5.774±97 | 60±13 | 13±1 | 99 |
| I4 (Controle) | 6.145±101 | 75±2 | 17±1 | 99 |
| IF (fumarato*) | 6.947±66 | 58±4 | 31±2 | 99 |
| IE (etanol*) | 10.583±512 | 36±4 | 43±1 | 96 |
| IM (metanol:etanol*) | 8.141±191 | 55±2 | 35±2 | 99 |

P: potencial metanogênico; *λ*: tempo para iniciar a produção de biogás; *Rm*: velocidade máxima de produção de metano; **Controle**: esgoto sanitário; **D1**: 7,11 ±0,02 mgDCF L⁻¹; **D2**: 13,60±0,03 mgDCF L⁻¹; **D3**: 26,21±0,04 mgDCF L⁻¹; **D4**: 43,10±0,01 mgDCF L⁻¹; **DF**: 44,13±0,02 mgDCF L⁻¹ + Fumarato*; **DE**: 43,20±0,01 mgDCF L⁻¹ + Etanol*; **DM**: 44,41±0,05 mgDCF L⁻¹ + Metanol:Etanol*; **I1**: 6,11±0,01 mgIBU L⁻¹; **I2**: 11,20±0,01 mgIBU L⁻¹; **I3**: 26,02±0,05 mgIBU L⁻¹; **I4**: 43,12±0,03 mgIBU L⁻¹; **IF**: 42,44±0,02 mgIBU L⁻¹ + Fumarato*; **IE**: 43,42±0,03 mgIBU L⁻¹ + Etanol*; **IM**: 42,61±0,05 mgIBU L⁻¹ + Metanol:Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO**: demanda química de oxigênio.

Fáberová et al. (2019) também observaram maior produção de biogás para maiores concentrações de DCF e IBU (500 μg L⁻¹), quando comparada a menores concentrações (10 μg L⁻¹) em reator anaeróbio (1 gST L⁻¹). Em contraste, para 100 mg L⁻¹ de DCF, Symsaris et al., (2015) relataram diminuição da produção de metano (7%-38%), em lodo oriundo de ETE (4,56-

11,68 gSTV L⁻¹) alimentado com acetato. Além disso, segundo os autores, inibição completa da metanogênese foi observada para 3.000 mgDCF L⁻¹. Destaca-se, portanto, que neste estudo, o aumento da concentração de DCF e IBU em 43,10±0,01 mg L⁻¹ e 43,12±0,03 mg L⁻¹, respectivamente, não inibiu a produção de metano.

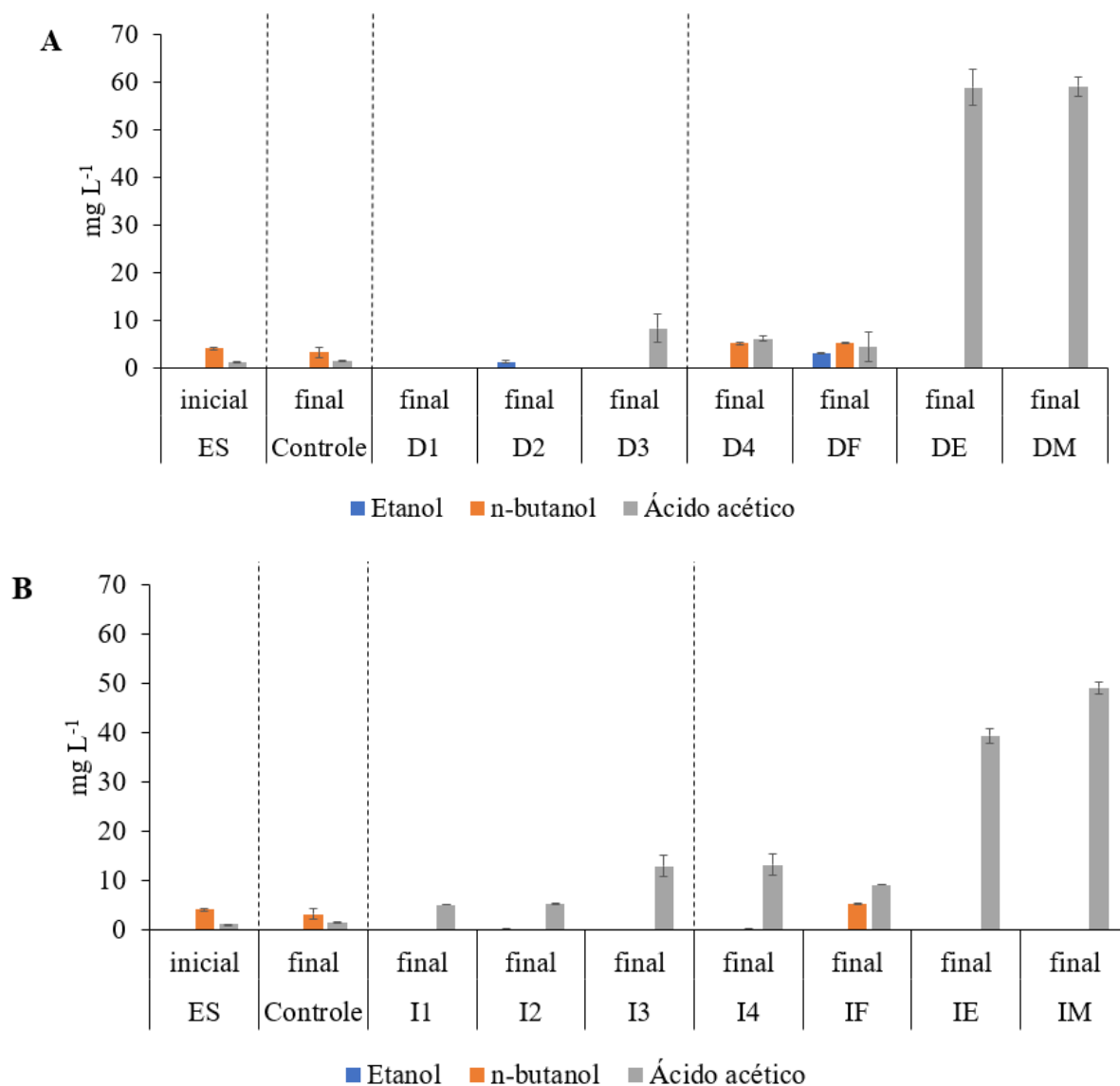
Nos ensaios contendo cossustratos verificou-se maior potencial metanogênico devido a maior concentração de matéria orgânica inicial, que ocorreu devido ao acréscimo de 200 mgDQO L⁻¹ dos cossustratos. Além disso, a codigestão de diferentes compostos orgânicos em esgoto sanitário (GRANATTO et al., 2019) com substratos sintéticos, pode resultar em efeitos sinérgicos e aumentar a produção de biogás (ESPOSITO et al. 2012).

Geralmente, cerca de 70% do metano é formado a partir de acetato, enquanto o restante é formado a partir de H₂/CO₂ (STAMS et al., 2012). Na rota do etanol, há maior formação de acetato em comparação a metanol e fumarato (Tabela 5.3), o que justifica o maior *P* na presença de etanol. De fato, notou-se maiores concentrações de ácido acético nos reatores aos quais foram adicionados etanol e metanol:etanol (Figura 5.2).

Tabela 5.3 - Reações envolvidas no processo sintrófico de formação de metano.

| Reações | Fonte |
|---|--|
| Fumarato | |
| (A) Fumarato + H ₂ O → Malato Malato → oxaloacetato + 2 H ⁺ Oxaloacetato → piruvato + CO ₂ Piruvato → acetato + CO ₂ + 2 H ⁺ | Stams, (1994) |
| (B) 3 Fumarato + propionato → acetato + 3 succinato | |
| Etanol | |
| Etanol + H ₂ O → acetato + H ⁺ + 2 H ₂ | Stams, (1994) |
| Metanol | |
| (A) Metanol + 2H ⁺ + 2e → H ₂ O + CH ₄ | Florencio; Field; Lettinga, (1995) |
| (B) 4 Metanol + 2 HCO ₃ ⁻ → 3 acetato + H ⁺ + 4 H ₂ O | |
| (C) 10 Metanol + 2 HCO ₃ ⁻ → 3 butirato + H ⁺ + 10 H ₂ O | |
| Ácidos graxos: propionato, butirato, formato e acetato | |
| (A) Propionato ⁻ + 3 H ₂ O → acetato ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂ | Stams et al., (2012) Stams, (1994) |
| (B) Propionato ⁻ + 2 HCO ₃ ⁻ → acetato ⁻ + H ⁺ + 3 formate | |
| (C) Butirato ⁻ + 2 H ₂ O → 2 acetato ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂ | |
| (D) Butirato ⁻ + 2 HCO ₃ ⁻ → 2 acetato ⁻ + H ⁺ + 2 formato ⁻ + 3 H ₂ O | |
| (E) 4 Formato ⁻ + H ⁺ → 3HCO ₃ ⁻ + 2 H ₂ O + CH ₄ | |
| (D) Acetato ⁻ + 4 H ₂ O → 2 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 4 H ₂ | |
| Compostos aromáticos | |
| (A) 3 clorobenzoato ⁻ + H ₂ → benzoato ⁻ + H ⁺ + Cl ⁻ Benzoato ⁻ + 7 H ₂ O → 3 acetato ⁻ + HCO ₃ ⁻ + 3 H ⁺ + 3 H ₂ | Stams, (1994) |
| (B) Hidroxibenzoato ⁻ + 6 H ₂ O → 3 acetato ⁻ + HCO ₃ ⁻ + 3 H ⁺ + 2 H ₂ | |
| (C) Fenol + 5 H ₂ O → 3 acetato ⁻ + 3 H ⁺ + 2 H ₂ | |
| Hidrogênio e carbonato | |
| (A) 4 H ₂ + 2 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → acetato ⁻ + 4 H ₂ O | Stams, (1994) |
| (B) 4 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → 3 H ₂ O + CH ₄ | |
| Clivagem de acetato | |
| (A) Acetato ⁻ + H ₂ O → HCO ₃ ⁻ + CH ₄ | Stams, (1994) |
| (B) Acetato + ATP → acetil-fosfato + ADP | |
| (C) Acetil-fosfato + HS-CoA → acetil-CoA + P _i | |
| (D) Acetato + 2 ATP + HS-CoA → acetil-CoA + 2 ADP + 2P _i | |

Figura 5.2 - Ácidos orgânicos voláteis no esgoto sanitário inicial de todos os ensaios (ES) e ao final dos ensaios de reatores em bateladas Controle, diclofenaco (A) e ibuprofeno (B).



Fonte: Autora.

Controle: esgoto sanitário; **D1:** $7,11 \pm 0,02$ mgDCF L⁻¹; **D2:** $13,60 \pm 0,03$ mgDCF L⁻¹; **D3:** $26,21 \pm 0,04$ mgDCF L⁻¹; **D4:** $43,10 \pm 0,01$ mgDCF L⁻¹; **DF:** $44,13 \pm 0,02$ mgDCF L⁻¹ + Fumarato*; **DE:** $43,20 \pm 0,01$ mgDCF L⁻¹ + Etanol*; **DM:** $44,41 \pm 0,05$ mgDCF L⁻¹ + Metanol:Etanol*; **I1:** $6,11 \pm 0,01$ mgIBU L⁻¹; **I2:** $11,20 \pm 0,01$ mgIBU L⁻¹; **I3:** $26,02 \pm 0,05$ mgIBU L⁻¹; **I4:** $43,12 \pm 0,03$ mgIBU L⁻¹; **IF:** $42,44 \pm 0,02$ mgIBU L⁻¹ + Fumarato*; **IE:** $43,42 \pm 0,03$ mgIBU L⁻¹ + Etanol*; **IM:** $42,61 \pm 0,05$ mgIBU L⁻¹ + Metanol:Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹.

Na ausência de cossustratos, maior tempo para iniciar a produção de metano (λ) foi observada conforme o aumento das concentrações dos fármacos (Tabela 5.2). Entretanto, observou-se valores similares de velocidade máxima de produção de metano (R_m) entre a

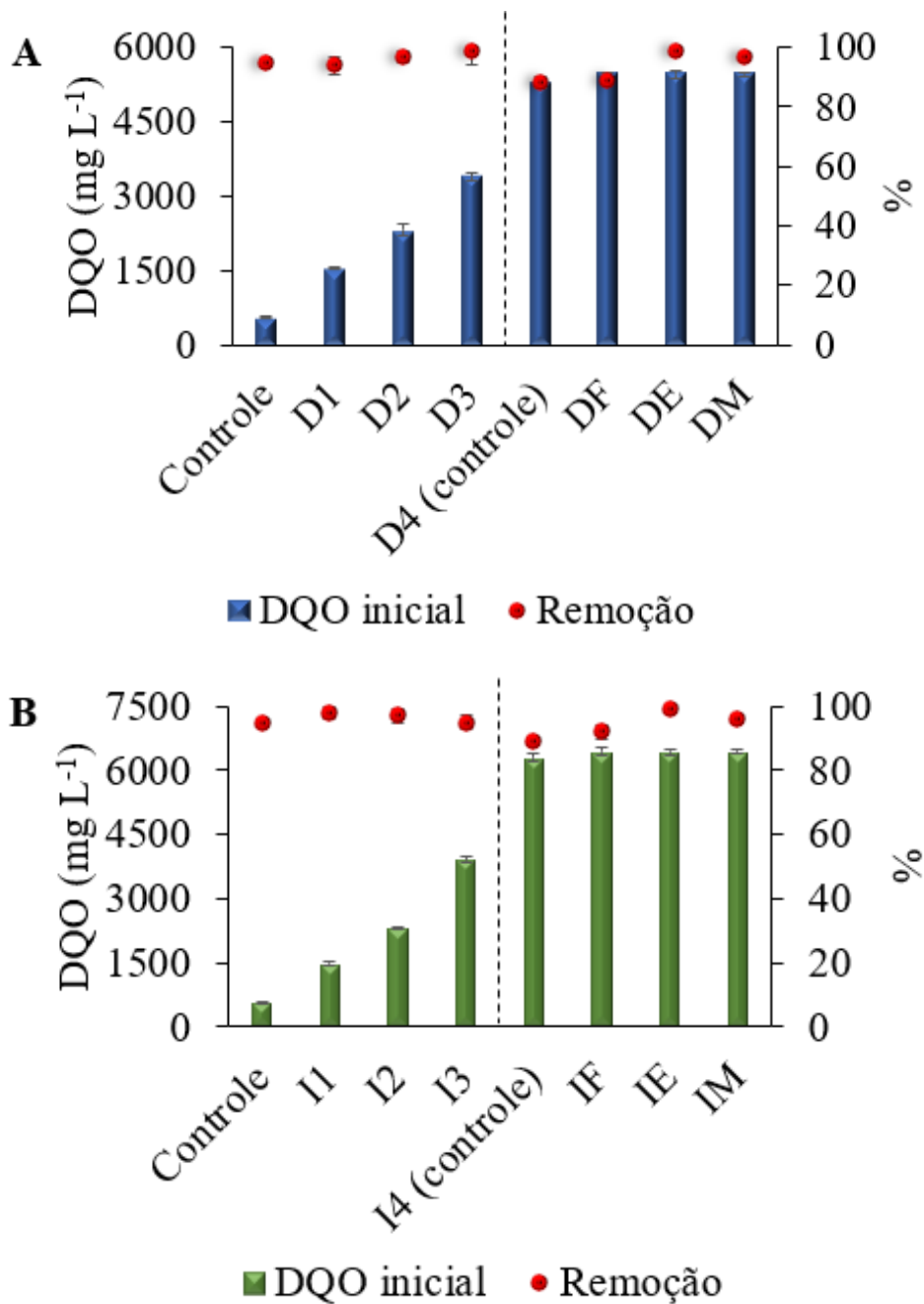
condição Controle e os ensaios contendo maiores concentrações de DCF (D4) e IBU (I4). As R_m do Controle, D4 e I4 foram de $20 \pm 3 \mu\text{mol h}^{-1}$, $20 \pm 1 \mu\text{mol h}^{-1}$ e $17 \pm 1 \mu\text{mol h}^{-1}$, respectivamente. O aumento da concentração de substratos complexos, como tais fármacos, implica em maior tempo para adaptação da biomassa (ESPOSITO et al. 2012). Isto demonstra adaptação dos microrganismos à presença dos fármacos, que após desenvolvimento de funções metabólicas (maiores λ), houve mineralização da matéria orgânica a metano, resultando em valores similares de velocidade máxima de produção de metano (R_m).

Dentre todos os ensaios, notou-se maiores R_m na presença dos cossustratos, ou seja, a produção de metano foi mais rápida (Tabela 5.2). Maior valor de R_m foi observado empregando etanol (DE: $43 \pm 1 \mu\text{mol h}^{-1}$; IE: $43 \pm 1 \mu\text{mol h}^{-1}$), seguido de metanol:etanol (DM: $38 \pm 2 \mu\text{mol h}^{-1}$; IM: $35 \pm 2 \mu\text{mol h}^{-1}$) e fumarato (DF: $32 \pm 4 \mu\text{mol h}^{-1}$; IF: $31 \pm 2 \mu\text{mol h}^{-1}$). O menor valor de R_m na presença de fumarato ocorreu devido ao maior valor de λ nesses ensaios (DF: $90 \pm 5\text{h}$; IF: $58 \pm 4\text{h}$), sendo necessário maior tempo para conversão metabólica e geração de subprodutos para as arqueias produzirem metano. A partir do fumarato tem-se duas possíveis rotas de formação de acetato, sendo via malato ou propionato (STAMS, 1994) (Tabela 5.3), o que justifica o maior P nos ensaios contendo fumarato em relação a ausência de cossustrato. Todavia, o fumarato deve passar por diferentes metabólicas, tornando esse processo mais lento em comparação as rotas de etanol e metanol (Tabela 5.3).

Menor tempo para iniciar a produção de metano foi observado na presença de etanol (DE: $52 \pm 4\text{h}$; IE: $36 \pm 4\text{h}$), seguido de metanol:etanol (DM: $66 \pm 8\text{h}$; IM: $55 \pm 2\text{h}$). Tais álcoois, podem fornecer acetato prontamente para arqueias metanogênicas acetoclásticas (Tabela 5.3). Além disso, metanol pode ser usado diretamente por *Methanosarcina*, que são uma das principais produtoras de metano em consórcio anaeróbico (GUO et al., 2015), o que justifica o menor λ e maior R_m observados na presença de etanol e metanol:etanol.

A remoção de matéria orgânica foi acima de 88% para todas as condições (Figura 5.4), e o aumento da concentração dos fármacos não prejudicou o consumo de matéria orgânica. Dentre todas as condições, maior eficiência de remoção de matéria orgânica foi obtida empregando etanol, seguido de metanol:etanol e fumarato (Tabela 5.4). Portanto, a maior concentração de matéria orgânica promovida pelos cossustratos não interferiu na eficiência da remoção; em vez disso o uso dos cossustratos proporcionou fonte de carbono degradável via cometabolismo, resultando em maior eficiência de remoção de matéria orgânica, maior mineralização e maior produção de metano.

Figura 5.3 - Concentração inicial e eficiência de remoção da matéria orgânica dos ensaios contendo diclofenaco (A) e ibuprofeno (B).



Fonte: Autora.

Controle: esgoto sanitário; **D1:** 7,11 ±0,02 mgDCF L⁻¹; **D2:** 13,60±0,03 mgDCF L⁻¹; **D3:** 26,21±0,04 mgDCF L⁻¹; **D4:** 43,10±0,01 mgDCF L⁻¹; **DF:** 44,13±0,02 mgDCF L⁻¹ + Fumarato*; **DE:** 43,20±0,01 mgDCF L⁻¹ + Etanol*; **DM:** 44,41±0,05 mgDCF L⁻¹ + Metanol:Etanol*; **I1:** 6,11±0,01 mgIBU L⁻¹; **I2:** 11,20±0,01 mgIBU L⁻¹; **I3:** 26,02±0,05 mgIBU L⁻¹; **I4:** 43,12±0,03 mgIBU L⁻¹; **IF:** 42,44±0,02 mgIBU L⁻¹ + Fumarato*; **IE:** 43,42±0,03 mgIBU L⁻¹ + Etanol*; **IM:** 42,61±0,05 mgIBU L⁻¹ + Metanol:Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Tabela 5.4 - Eficiência da remoção de matéria orgânica dos ensaios com diclofenaco e ibuprofeno.

| | DQO¹ (mg L⁻¹) | Remoção (%) |
|---------------------|--|--------------------|
| Controle | 563±25 | 95±1 |
| Diclofenaco | | |
| Sem cossubstrato | | |
| D1 | 1.542±30 | 94±3 |
| D2 | 2.309±112 | 97±2 |
| D3 | 3.399±89 | 99±5 |
| D4 | 5.263±25 | 88±2 |
| Com cossubstrato | | |
| DF (fumarato) | 5.463±43 | 89±1 |
| DE (etanol) | 5.463±71 | 99±1 |
| DM (metanol:etanol) | 5.463±46 | 97±1 |
| Ibuprofeno | | |
| Sem cossubstrato | | |
| I1 | 1.477±40 | 98±2 |
| I2 | 2.309±12 | 97±2 |
| I3 | 3.903±75 | 95±2 |
| I4 | 6.293±96 | 89±1 |
| Com cossubstrato | | |
| IF (fumarato) | 6.436±83 | 92±2 |
| IE (etanol) | 6.436±74 | 99±1 |
| IM (metanol:etanol) | 6.436±57 | 96±1 |

1 DQO: demanda química de oxigênio medida no meio; **Controle:** esgoto sanitário; **D1:** 7,11 ±0,02 mgDCF L⁻¹; **D2:** 13,60±0,03 mgDCF L⁻¹; **D3:** 26,21±0,04 mgDCF L⁻¹; **D4:** 43,10±0,01 mgDCF L⁻¹; **DF:** 44,13±0,02 mgDCF L⁻¹ + Fumarato*; **DE:** 43,20±0,01 mgDCF L⁻¹ + Etanol*; **DM:** 44,41±0,05 mgDCF L⁻¹ + Metanol:Etanol*; **I1:** 6,11±0,01 mgIBU L⁻¹; **I2:** 11,20±0,01 mgIBU L⁻¹; **I3:** 26,02±0,05 mgIBU L⁻¹; **I4:** 43,12±0,03 mgIBU L⁻¹; **IF:** 42,44±0,02 mgIBU L⁻¹ + Fumarato*; **IE:** 43,42±0,03 mgIBU L⁻¹ + Etanol*; **IM:** 42,61±0,05 mgIBU L⁻¹ + Metanol:Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹.

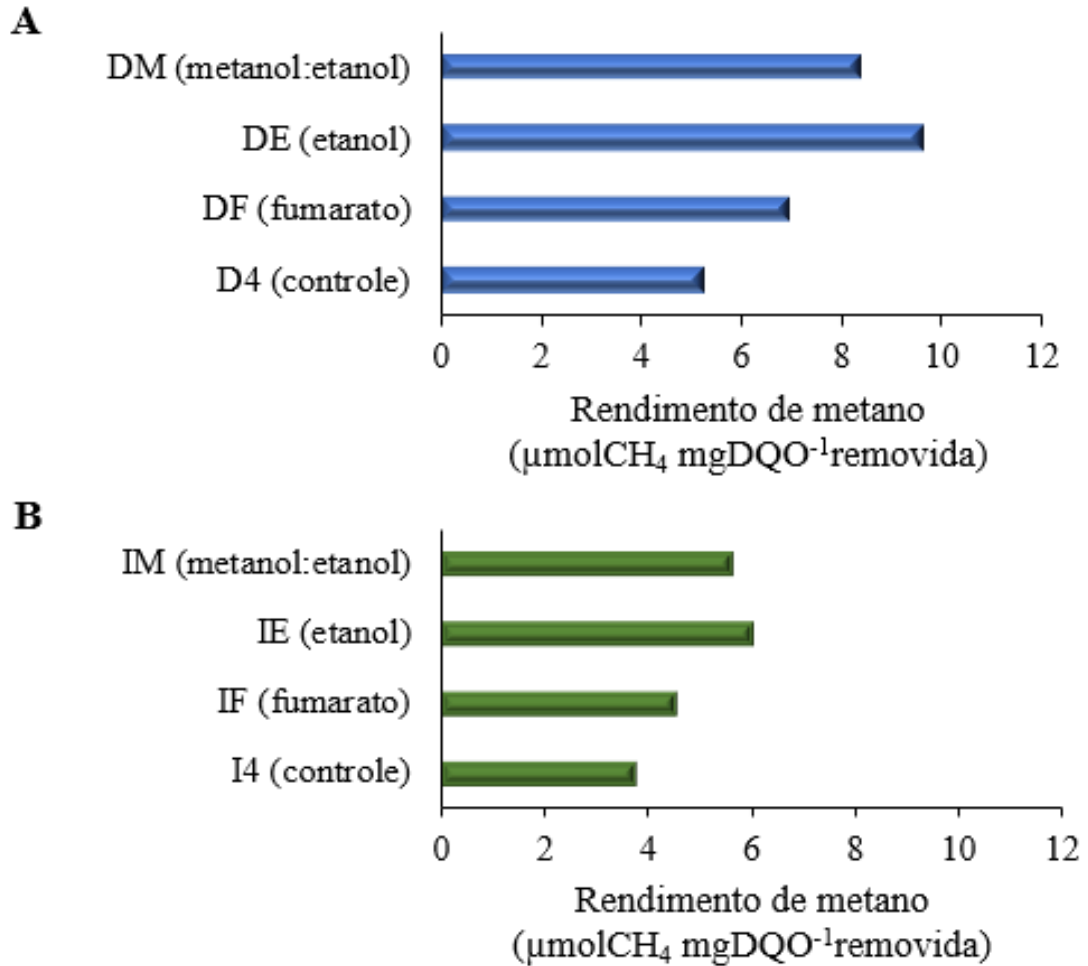
Dentre todos os ensaios, maior rendimento da produção de metano foi observado para a condição etanol, seguido de metanol:etanol e fumarato (Figura 5.4). O menor rendimento de metano na condição com metanol:etanol em comparação ao etanol, pode ser atribuído as conversões anaeróbias de metanol, que envolvem produção direta à metano ou conversão em acetato ou butirato (Tabela 5.3).

Para a condição com etanol obteve-se maior rendimento e produção de metano no ensaio com DCF (DE: 9,66 μmolCH₄ mg⁻¹DQO_{removida} e 11530±368 μmolCH₄) em comparação ao IBU (IE: 6,01 μmolCH₄ mg⁻¹DQO_{removida} e 10583±512 μmolCH₄). Este fato pode estar relacionado a estrutura molecular dos fármacos. O DCF é derivado do ácido benzoacético, que consiste em ácido fenilacético com um grupo (2,6-diclorofenil) amino na posição 2. A

formação de acetato a partir de DCF pode ter ocorrido por via cometabólica análoga a β -oxidação de clorobenzoato e benzoato (Tabela 5.3). A degradação pode prosseguir via derivados de CoA.

O IBU, por outro lado, é derivado do ácido propiônico, sendo um ácido monocarboxílico, no qual um dos hidrogênios na posição 2 é substituído por um grupo 4-(2-metilpropil) fenil. A oxidação completa de ácido propiônico pode representar 20-43% da formação total de metano (STAMS et al., 2012). Isso porque, para que a conversão de ácido propiônico em acético ocorra, é necessário relações sintróficas de protocooperação entre populações acetogênicas e metanogênicas hidrogenotróficas (STAMS et al., 2012). Tais possibilidades cometabólicas pode ter contribuído para que a proporção de produção de metano via metanogênese acetoclástica na presença de DCF tenha sido maior em comparação ao IBU. A metanogênese acetoclástica tem maior contribuição para produção do metano que a via hidrogenotrófica (STAMS et al., 2012). Desta forma, devido a estrutura química dos fármacos, obteve-se maior rendimento de metano com DCF.

Figura 5.4 - Rendimento de metano dos ensaios contendo diclofenaco (A) e ibuprofeno (B) na ausência de cossustrato (D4 e I4) e presença de fumarato (DF e IF), etanol (DE e IE) e metanol:etanol (DM e IM).



Fonte: Autora.

D4: $43,10 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1}$; **DF:** $44,13 \pm 0,02 \text{ mgDCF L}^{-1} + \text{Fumarato}^*$; **DE:** $43,20 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1} + \text{Etanol}^*$; **DM:** $44,41 \pm 0,05 \text{ mgDCF L}^{-1} + \text{Metanol:Etanol}^*$; **I4:** $43,12 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1}$; **IF:** $42,44 \pm 0,02 \text{ mgIBU L}^{-1} + \text{Fumarato}^*$; **IE:** $43,42 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1} + \text{Etanol}^*$; **IM:** $42,61 \pm 0,05 \text{ mgIBU L}^{-1} + \text{Metanol:Etanol}^*$; $^*200 \text{ mgDQO L}^{-1}$; **DQO:** demanda química de oxigênio.

O pH inicial e final de todas as séries experimentais foram próximos a neutralidade (Tabela 5.6) e a adsorção de DCF e IBU, para todas as condições, foi abaixo de 2% (Tabela 5.5). A repulsão eletrostática entre a superfície de lodo em pH neutro (que possui carga negativa) e moléculas de fármacos de hidrofobicidade moderada, está relacionada a baixa adsorção de DCF e IBU (JOSS et al. 2005; STEVENS-GARMON et al. 2011; ESTEVEZ et al., 2014; JIA et al. 2020). Jia et al., (2020), por exemplo, observaram adsorção de IBU inferior a

10% para 100-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em reator UASB. Portanto, neste estudo, observa-se que a adsorção não foi a principal via de remoção dos fármacos. Entretanto, notou-se maior adsorção de DCF em comparação ao IBU (Tabela 5.5). Isso ocorreu porque o coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) do DCF (4,02) é maior que do IBU (3,79), e quanto maior o Log Kow de uma substância, maior é sua tendência de acumulação em lodo (BARESEL et al., 2015).

Menor remoção e degradação de DCF e IBU foi observado na ausência de cossustratos ou na presença de fumarato (Tabela 5.5). Entretanto, notou-se aumento da remoção e degradação de DCF e IBU conforme o aumento de suas concentrações na ausência de cossustratos (Tabela 5.5). Em relação a remoção de DCF, verificou-se aumento de $11,01\pm 0,50\%$ para $17,23\pm 0,91\%$ em D1 e D4, respectivamente. Todavia, para o IBU observou-se aumento da remoção de $3,01\pm 0,11\%$, para $12,60\pm 1,50\%$ em I1 e I4, respectivamente. Na condição com etanol obteve-se ainda maior degradação, sendo de $27,15\pm 0,30\%$ e $18,52\pm 0,23\%$ para DCF e IBU, respectivamente; seguido de metanol:etanol, que foi de $24,72\pm 0,83\%$ e $15,12\pm 0,22\%$, respectivamente. Para todas as condições, foi observado menor remoção de IBU (abaixo de 19%) em comparação ao DCF (acima de 28%).

Tabela 5.5 - Remoção, adsorção e degradação de diclofenaco e ibuprofeno em reatores em batelada.

| | Concentração inicial (mg L^{-1}) | Remoção (%) | Adsorção (%) | Degradação (%) |
|-------------------------|--|-----------------|-----------------|-------------------|
| Diclofenaco | | | | |
| D1 | $7,11\pm 0,02$ | $11,01\pm 0,50$ | $1,03\pm 0,05$ | $10,06\pm 0,07$ |
| D2 | $13,60\pm 0,03$ | $7,22\pm 0,31$ | $1,56\pm 1,23$ | $5,59\pm 1,07$ |
| D3 | $26,21\pm 0,04$ | $4,11\pm 0,52$ | $0,98\pm 0,03$ | $3,23\pm 0,45$ |
| D4 | $43,10\pm 0,01$ | $17,23\pm 0,91$ | $1,58\pm 0,06$ | $15,72\pm 0,12$ |
| DF (fumarato*) | $44,13\pm 0,02$ | $10,70\pm 1,11$ | $1,86\pm 0,11$ | $8,92\pm 0,45$ |
| DE (etanol*) | $43,20\pm 0,01$ | $28,24\pm 1,10$ | $1,06\pm 0,31$ | $27,15\pm 0,30$ |
| DM (metanol:etanol*) | $44,41\pm 0,05$ | $26,11\pm 1,40$ | $1,23\pm 0,32$ | $24,72\pm 0,83$ |
| Ibuprofeno | | | | |
| I1 | $6,11\pm 0,01$ | $3,01\pm 0,11$ | $0,58\pm 0,02$ | $2,40\pm 0,02$ |
| I2 | $11,20\pm 0,01$ | $0,13\pm 0,30$ | $0,08\pm 0,02$ | $0,05\pm 0,01$ |
| I3 | $26,02\pm 0,05$ | $0,52\pm 0,42$ | $0,11\pm 0,01$ | $0,40\pm 0,02$ |
| I4 | $43,12\pm 0,03$ | $12,60\pm 1,50$ | $0,32\pm 0,51$ | $12,20\pm 1,23$ |
| IF (fumarato*) | $42,44\pm 0,02$ | $4,71\pm 1,11$ | $0,23\pm 0,45$ | $4,46\pm 0,52$ |
| IE (etanol*) | $43,42\pm 0,03$ | $18,72\pm 1,60$ | $0,13\pm 0,21$ | $18,52\pm 0,23$ |
| IM (metanol:etanol*) | $42,61\pm 0,05$ | $15,32\pm 0,31$ | $0,19\pm 0,36$ | $15,12\pm 0,22$ |

*200 mgDQO L^{-1} ; **DQO**: demanda química de oxigênio.

Tabela 5.6 - pH, alcalinidade total e ácidos orgânicos voláteis totais (AOV) dos ensaios em reatores em batelada com diclofenaco e ibuprofeno.

| | pH | | Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹) | | AOV (mgHAC L ⁻¹) | |
|--------------------|-----------|------------|---|--------------|------------------------------|--------------|
| | inicial | final | inicial | final | inicial | final |
| Controle | 6,71±0,32 | 7,02±0,53 | 98,45±0,57 | 125,3±24,77 | 59,21±0,25 | 103,63±60,63 |
| Diclofenaco | | | | | | |
| D1 | 7,06±0,44 | 7,53±0,82 | 57,28±1,63 | 133,53±65,24 | 4,38±0,42 | 4,38±0,27 |
| D2 | 6,86±0,15 | 7,1±0,88 | 114,20±10,47 | 212,29±74,28 | 76,10±0,36 | 7,99±0,84 |
| D3 | 6,71±0,38 | 7,35±0,72 | 98,45±2,20 | 172,91±54,87 | 59,21±1,75 | 4,78±0,57 |
| D4 | 6,91±0,24 | 7,14±0,53 | 66,58±0,61 | 107,76±10,74 | 52,99±3,36 | 21,67±2,36 |
| DF | 6,95±0,36 | 9,98±0,41 | 173,63±14,27 | 619,43±58,32 | 90,61±4,57 | 13,94±0,82 |
| DE | 6,98±0,13 | 7,33±0,89 | 71,6±4,74 | 241,22±74,95 | 48,64±0,74 | 0,31±0,11 |
| DM | 6,95±0,47 | 7,31±0,72 | 70,88±1,28 | 272,12±89,23 | 101,97±47,31 | 64,67±0,73 |
| Ibuprofeno | | | | | | |
| I1 | 7,06±0,34 | 7,56±0,65 | 57,28±0,84 | 129,24±7,54 | 5,59±0,23 | 4,38±0,05 |
| I2 | 6,86±0,21 | 7,53±0,34 | 114,20±12,66 | 190,10±47,07 | 76,10±4,76 | 0,47±0,87 |
| I3 | 6,91±0,14 | 7,5±0,81 | 66,59±5,64 | 91,65±68,25 | 21,67±0,79 | 9,78±0,79 |
| I4 | 6,91±0,11 | 7,4±0,80 | 66,58±1,74 | 124,94±11,15 | 21,67±0,12 | 9,61±0,48 |
| IF | 7,38±0,12 | 11,67±0,21 | 479,68±0,20 | 566,85±65,32 | 23,16±0,67 | 46,26±0,17 |
| IE | 7,41±0,40 | 6,7±0,36 | 76,10±3,74 | 217,70±89,21 | 54,07±2,89 | 26,57±2,31 |
| IM | 7,53±0,32 | 6,71±0,45 | 71,49±0,11 | 236,61±14,89 | 26,62±3,54 | 27,10±0,06 |

Controle: esgoto sanitário; **D1:** 7,11 ±0,02 mgDCF L⁻¹; **D2:** 13,60±0,03 mgDCF L⁻¹; **D3:** 26,21±0,04 mgDCF L⁻¹; **D4:** 43,10±0,01 mgDCF L⁻¹; **DF:** 44,13±0,02 mgDCF L⁻¹ + Fumarato*; **DE:** 43,20±0,01 mgDCF L⁻¹ + Etanol*; **DM:** 44,41±0,05 mgDCF L⁻¹ + Metanol:Etanol*; **I1:** 6,11±0,01 mgIBU L⁻¹; **I2:** 11,20±0,01 mgIBU L⁻¹; **I3:** 26,02±0,05 mgIBU L⁻¹; **I4:** 43,12±0,03 mgIBU L⁻¹; **IF:** 42,44±0,02 mgIBU L⁻¹ + Fumarato*; **IE:** 43,42±0,03 mgIBU L⁻¹ + Etanol*; **IM:** 42,61±0,05 mgIBU L⁻¹ + Metanol:Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio.

A recalcitrância de DCF e IBU está relacionada as suas estruturas moleculares, uma vez que a densidade eletrônica de sistemas aromáticos reduz a biodisponibilidade das moléculas para serem utilizadas como receptores de elétrons pelos microrganismos (FUCHS, BOLL, e HEIDER 2011; GHATTAS et al., 2017). Além disso, a transformação de fármacos é dependente da presença ou ausência de grupos funcionais que doam/recebem elétrons (YANG et al., 2016). Por exemplo, compostos com fortes grupos funcionais doadores de elétrons, como hidroxilas, são mais facilmente degradáveis por digestão anaeróbia, enquanto compostos com fortes grupos funcionais que retiram elétrons, como o ácido carboxílico presente em DCF e

IBU, são mais resistentes à digestão anaeróbia (YANG et al., 2016). Entretanto, a digestão anaeróbia de compostos recalcitrantes em concentrações relativamente maiores pode induzir processos de adaptação que, após a fase de desenvolvimento de funções metabólicas, levam à degradação desses poluentes (GHATTAS et al., 2017). No presente estudo, o maior tempo de adaptação da biomassa (λ) e maior produção de metano (P) observados para maiores concentrações dos fármacos (Tabela 5.2) podem estar relacionados ao desenvolvimento das atividades enzimáticas dos microrganismos, resultando em maior remoção de DCF e IBU (Tabela 5.5).

DCF e IBU são removidos principalmente por cometabolismo (FISCHER e MAJEWSKY, 2014; GONZALEZ-GIL et al., 2018). Enzimas extracelulares, como as hidrolases, estão envolvidas na biotransformação de diversos contaminantes emergentes, como o DCF (KRAH et al., 2016). Entretanto, recentemente foi demonstrado que enzimas intracelulares, como acetato quinase e monooxigenases, também podem biotransformar compostos que são relativamente pequenos (1-2 anéis aromáticos), como DCF e IBU (FISCHER e MAJEWSKY, 2014; FERNANDEZ-FONTAINA et al., 2016; KRAH et al., 2016; GONZALEZ-GIL et al., 2017; 2018). Além disso, a transformação enzimática de DCF e IBU, por meio da enzima acetato quinase foi demonstrada por Gonzalez-Gil et al., (2017). Tais autores relataram que compostos que contêm grupo carboxila ou hidroxila e têm impedimento estérico, como DCF e IBU, foram enzimaticamente transformados por fosforilação, sugerindo que a estimulação da metanogênese acetoclástica auxilia na degradação de tais fármacos (GONZALEZ-GIL et al., 2017).

Portanto, no presente estudo, a maior remoção de DCF e IBU empregando etanol como cossustrato, pode estar relacionada a maior estimulação de acetato quinase, devido a maior formação de acetato oriundo da oxidação deste álcool (Tabela 5.3). Esse aspecto foi melhor evidenciado nas condições com DCF em relação ao IBU, em que foi observado maior produção e rendimento de metano (Tabela 5.2 e Figura 5.4). Este fato pode estar relacionado a maior remoção de DCF em comparação ao IBU, mesmo na presença de etanol ou metanol:etanol.

Menor remoção de DCF ($10,70 \pm 1,11\%$) e IBU ($4,71 \pm 1,11\%$) foi observada na presença de fumarato. Gonzalez-Gil et al., (2017) relataram que a transformação de diversos compostos recalcitrantes, incluindo DCF e IBU, é fortuita e inerentemente ligada ao acetato, uma vez que se trata de um substrato primário para desencadear a síntese de acetato quinase. Bactérias que usam fumarato como substrato liberam H_2 e formiato e a oxidação de acetato pode ser inibida

na presença de H₂ no meio (ASANUMA et al., 1999; WU et al., 2000). Assim, o uso de fumarato pode ter favorecido processos fermentativos para a produção de H₂ e, conseqüente, diminuído a síntese de acetato quinase. A maior produção de metano é realizada via metanogênese acetoclástica em comparação a hidrogenotrófica (STAMS et al., 2012; GUO et al., 2015). No presente estudo, esta observação é corroborada pela menor *P* e rendimento de metano na presença de fumarato em comparação aos ensaios contendo etanol e metanol:etanol (Tabela 5.2 e Figura 5.4). Motteran et al., (2020) também observaram menor produção de metano utilizando fumarato como cossustrato em comparação ao uso de acetato, em reatores em bateladas com surfactante LAS.

5.1.2.1. Diversidade microbiana dos reatores de maior remoção de diclofenaco e ibuprofeno

Caracterização taxonômica foi realizada a partir de seqüências do gene RNAr 16S para obter informações sobre a diversidade microbiana da biomassa dos reatores nos quais foi utilizado etanol como cossustrato e observado maior degradação de DCF (DE) e IBU (IE). A cobertura de Good (Tabela 5.7) para os Domínios Bacteria e Archaea, em ambas as amostras de lodo, foi superior a 99%. Além disso, por meio das análises de curva de rarefação (Figura 5.5) foi observado platô, com provável representação satisfatória de populações microbianas. As seqüências do Domínio Bacteria de DE (43.290) e IE (54.055) foram agrupadas em 479 e 471 OTU, respectivamente. Para o Domínio Archaea, tanto as seqüências de DE (12481), como as de IE (7884) foram agrupadas em 17 OTU.

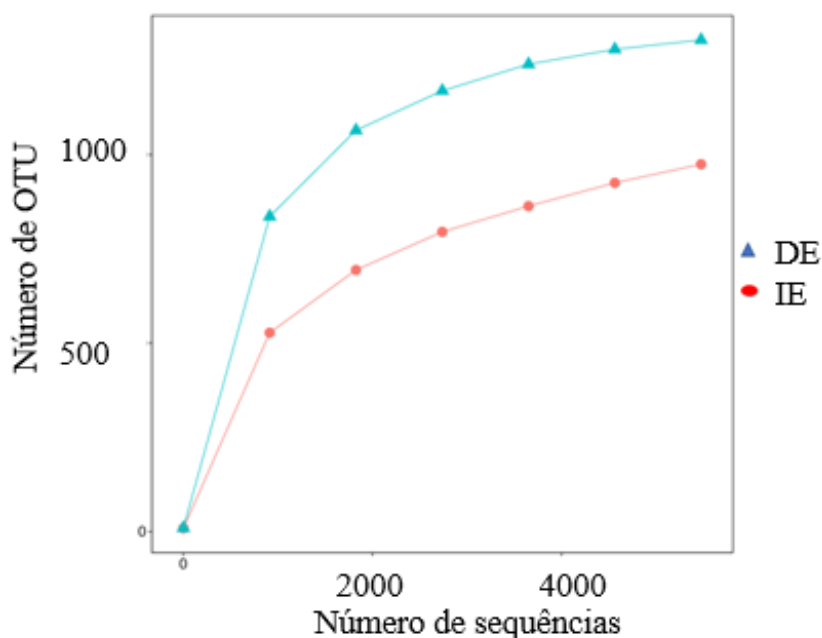
Para o Domínio Bacteria observou-se maior diversidade (índice de Shannon) e maior riqueza (índice de Chao 1) para biomassa exposta a DCF (DE) em relação a exposta a IBU (IE) (Tabela 5.7). A presença de compostos tóxicos foi relacionada a maior diversidade bacteriana (ZHAO et al. 2016; MOTTERAN et al., 2018; DELFORNO et al., 2019). A toxicidade de compostos organoclorados, como DCF, exercida na comunidade microbiana anaeróbia, foi observada em estudos anteriores (SYMSARIS et al., 2015; ZHAO et al. 2016). Desta forma, maior diversidade e menor dominância de populações de bactérias foi observado em DCF em relação ao IBU. Em consonância, para o Domínio Bacteria, o valor do índice de Dominance do lodo exposto a DCF (0,04) foi menor que ao exposto a IBU (0,08).

Tabela 5.7 - Índices ecológicos dos Domínios Bacteria e Archaea dos ensaios em reatores em batelada de maior remoção de diclofenaco (DE) e ibuprofeno (IE) utilizando etanol como cossustrato.

| Índices | Domínio Bacteria | | Domínio Archaea | |
|---------------|------------------|--------|-----------------|-------|
| | DE | IE | DE | IE |
| Good coverage | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Shannon H | 4,14 | 3,53 | 1,22 | 0,98 |
| Chao 1 | 491,10 | 478,20 | 17,00 | 17,00 |
| Dominance | 0,04 | 0,08 | 0,47 | 0,57 |

DE: $43,2 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1} + \text{Etanol}^*$; **IE:** $43,4 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1} + \text{Etanol}^*$; *200 mgDQO L^{-1} ; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Figura 5.5 - Curva de rarefação dos ensaios em reatores em bateladas de maior remoção de diclofenaco (DE) e ibuprofeno (IE) utilizando etanol como cossustrato.



Fonte: Autora.

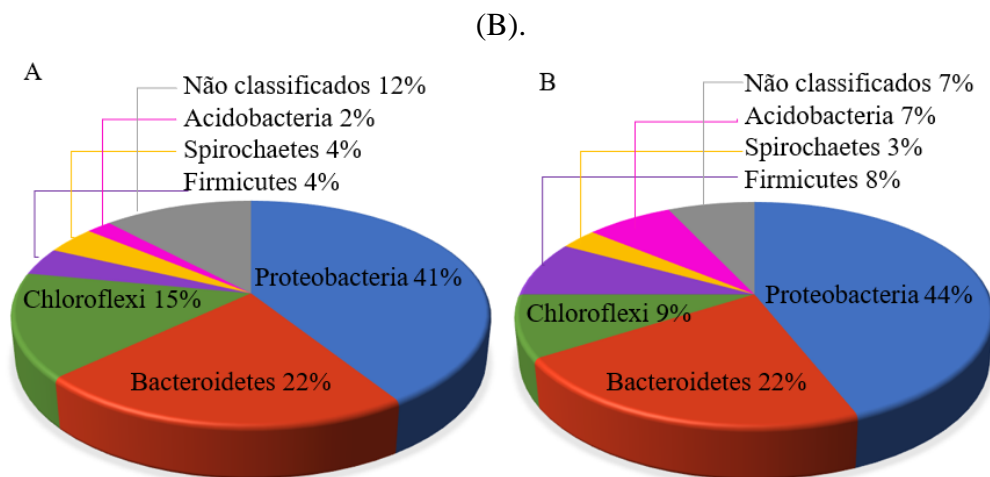
DE: $43,20 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1} + \text{Etanol}^*$; **IE:** $43,42 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1} + \text{Etanol}^*$; *200 mgDQO L^{-1} ; **DQO:** demanda química de oxigênio.

A partir dos dados da classificação taxonômica observou-se que a comunidade microbiana de DE e IE foi constituída de 92% e 95% de populações do Domínio Bacteria, respectivamente, e 8% e 5% do Domínio Archaea, respectivamente.

Dentre o Domínio Bacteria, tanto em DE, como em IE, foi observada maior abundância relativa para os Filos Proteobacteria e Bacteroidetes (Figura 5.6). Membros do Filo Proteobacteria são anaeróbios facultativos ou obrigatórios, quimioautotróficos e heterotróficos

(GUPTA, 2000). Bacteroidetes, por sua vez, são considerados eficientes em degradar moléculas de alto peso molecular, tais como proteínas e carboidratos (THOMAS et al., 2011). O terceiro Filo de maior abundância relativa em ambas as amostras de lodo foi Chloroflexi (Figura 5.6). Entretanto, notou-se maior abundância relativa de tal Filo na comunidade bacteriana que foi exposta ao DCF (15%), quando comparada aquela exposta ao IBU (9%). Este fato, provavelmente, está relacionado aos átomos de cloro presentes na estrutura molecular do DCF. Membros do Filo Chloroflexi participam da degradação de compostos halogenados (Krzmarzick et al., 2012) e bactérias desalogenadoras pertencentes a tal Filo podem ser enriquecidas em ambientes contendo poluentes clorados (KRZMARZICK et al., 2012; MCNAMARA e KRZMARZICK, 2013).

Figura 5.6 - Abundância relativa dos Filos do Domínio Bacteria da biomassa ao final da operação dos reatores em bateladas contendo etanol e diclofenaco (A) e etanol e ibuprofeno (B).



Fonte: Autora.

DE: $43,20 \pm 0,01$ mgDCF L⁻¹ + Etanol*; **IE:** $43,42 \pm 0,03$ mgIBU L⁻¹ + Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Além dos átomos de cloros, a estrutura molecular de DCF contém um grupo acetado, e seus dois anéis benzênicos são ligados por uma porção amina (anilina). Segundo Ghattas et al. (2017), a degradação anaeróbia de DCF pode ocorrer inicialmente por meio de descloração redutiva, seguida de descarboxilação do fenilacetato. A descarboxilação anaeróbia do fenilacetato é realizada por β -oxidação análoga à do benzoil-CoA, em que no final do processo há formação de ácido acético (GHATTAS et al., 2017). O IBU também é constituído por anel aromático, que contém um grupo ácido carboxílico. A clivagem anaeróbia de anéis aromáticos é frequentemente iniciada por adição e regeneração de fumarato a partir da formação do

composto central benzoil-CoA (FUCHS, BOLL, e HEIDER 2011; GHATTAS et al. 2017). Além disso, na via de biotransformação aeróbia do IBU foram relatadas reações que também ocorrem sob condições anaeróbias, tais como hidroxilação (QUINTANA; WEISS; REEMTSMA, 2005), carboxilação (ZWIENER et al., 2002) e descarboxilação (JIA et al., 2020). No presente estudo, os microrganismos do Domínio Bacteria identificados com maior abundância relativa relacionados a capacidade de realizar tais reações de degradação dos fármacos, além de outras vias importantes no processo anaeróbio, podem ser observados na Figura 5.7. Os demais gêneros (não apresentados no gráfico) foram identificados com abundância relativa inferior a 0,02%.

Figura 5.7 - Gêneros de maior abundância relativa (>0,02%) do Domínio Bacteria identificados na biomassa ao final da operação dos reatores contendo etanol e diclofenaco (DE) e etanol e ibuprofeno (IE).



Fonte: Autora.

AOV: ácidos orgânicos voláteis; **DE:** 43,20±0,01 mgDCF L⁻¹ + Etanol*; **IE:** 43,42±0,03mgIBU L⁻¹ + Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Os três gêneros de maior abundância relativa identificados em DE e IE foram *Smithella*, *Sulfuricurvum* e *Syntrophus* (Figura 5.7). Trata-se de microrganismos de ampla capacidade metabólica, que podem degradar compostos aromáticos em ambientes redutores e utilizar diversos compostos do esgoto sanitário (GRANATTO et al., 2019), assim como o cossustrato

etanol adicionado em ambos os ensaios. *Sulfuricurvum*, por exemplo, são anaeróbios facultativos e foram relacionados a clivagem de anéis aromáticos (LUEDERS, 2017). Representantes do gênero *Smithella* também são capazes de degradar anéis aromáticos, além de realizar β -oxidação e oxidar AOV e fumarato em acetato, podendo assim realizar sintrofismo com arqueias metanogênicas (DELFORNO et al., 2019; 2020). Microorganismos pertencentes a *Syntrophus* são estritamente anaeróbios e capazes de realizar β -oxidação e degradar cadeias de ácidos graxos e compostos aromáticos, fornecendo substratos para arqueias metanogênicas (DELFORNO et al., 2019; 2020). Além disso, esse grupo microbiano também é capaz de expressar a enzima álcool desidrogenase, sendo capazes de utilizar o cossustrato etanol adicionado nos ensaios (WEXLER et al., 2005; KUNG et al., 2010; MOTTERAN et al., 2018). Motteran et al., (2018) também observaram prevalência de *Syntrophus* durante a fase de operação de reator fluidificado em que foi adicionado etanol como cossustrato para remoção do surfactante LAS de água residuária de lavanderia comercial.

Os outros cinco gêneros do Domínio Bacteria identificados com maiores abundâncias relativas em DE e IE foram *Arcobacter*, *Pseudomonas*, *Syntrophorhabdus*, *Zooglea* e *Sulfurospirillum* (Figura 5.7). Organismos do gênero *Arcobacter* são anaeróbios facultativos e possuem capacidade metabólica de degradar compostos aromáticos e utilizar AOV, N_2 , nitrato e enxofre como receptores finais de elétrons (WAHLUND e MADIGAN, 1993; ROALKVAM et al., 2015). *Syntrophorhabdus* também foram relacionados à degradação de compostos aromáticos, utilizando-os como doadores de elétrons em condições anaeróbias e os convertendo em ácido acético (KUEVER, 2014; DELFORNO et al., 2019). *Sulfurospirillum* são anaeróbios estritos e consomem acetato, butirato, citrato, lactato e malato, além de também degradarem compostos aromáticos (KODAMA, 2004; GARRITY et al., 2005). *Pseudomonas*, por sua vez, são anaeróbios facultativos e foram relacionados a capacidade de realizar ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e clivagem de anéis aromáticos (DELFORNO et al., 2017; 2019; 2020). Representantes de tais gêneros são frequentemente identificados em reatores anaeróbios com esgoto sanitário, como no presente estudo, e exercem papel fundamental para degradar compostos recalcitrantes, como o LAS (DELFORNO et al., 2017; 2019; 2020; GRANATTO et al., 2019).

Portanto, pode-se observar que microrganismos pertencentes aos principais gêneros identificados em ambos os reatores com DCF e IBU possuem genes que codificam enzimas essenciais para a degradação de compostos recalcitrantes, tais como OCH CoA hydrolase putative e 6-oxocyclohex-1-ene-carbonyl-CoA hydrolase (clivagem de anéis aromáticos),

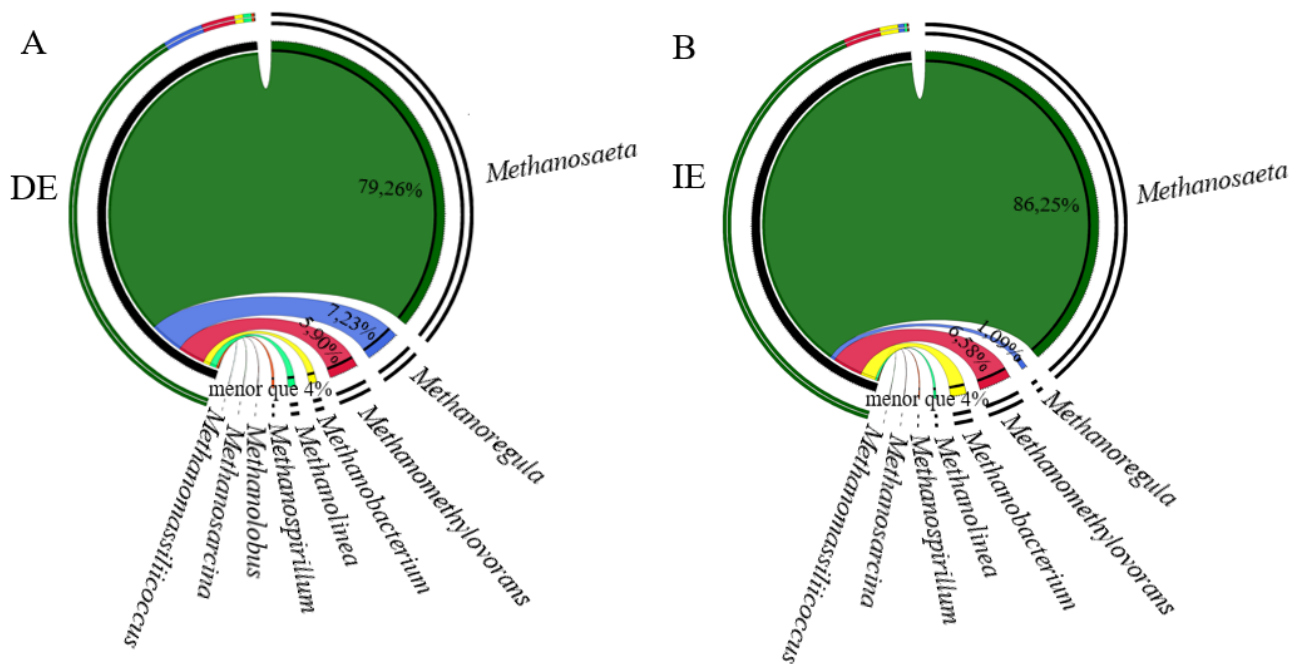
acetyl-CoA carboxylase, redutase, dehydrogenase e synthase (β -oxidação) e fumarato redutase (DELFORNO et al., 2017; 2019; 2020). Tais capacidades metabólicas podem atuar em diferentes etapas de degradação de compostos xenobióticos do esgoto sanitário, inclusive podem auxiliar na etapa inicial de degradação cometabólica de DCF e IBU para, posteriormente, ocorrer a clivagem de anel aromático (ZWIENER et al., 2002; QUINTANA et al., 2005; FUCHS, BOLL, e HEIDER 2011; GHATTAS et al. 2017; JIA et al., 2020). Além disso, trata-se de bactérias que podem ter sido enriquecidas na presença de etanol, podendo produzir metabólitos fermentativos, como CO₂, ácidos acético, propiônico, fórmico e lático, que podem servir de substrato para outros microrganismos (DELFORNO et al., 2017; MOTTERAN et al., 2018; DELFORNO et al., 2019; 2020).

Em relação aos gêneros identificados com menores abundâncias relativas (<0,3%), tem-se *Acidovorax*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Thauera*, *Dechloromonas*, *Clostridium* e *Syntrophobacter*. Representantes dos gêneros *Thauera* e *Dechloromonas* são anaeróbios facultativos e foram relacionados à degradação de compostos aromáticos clorados, tais como diclorofenol (COATES et al. 2001; BRENNER et al., 2005; CHAKRABORTY et al. 2005; LUEDERS 2017). Compostos aromáticos halogenados, como DCF, e outros compostos aromáticos do esgoto sanitário (GRANATTO et al., 2019), podem ser utilizados por tais microrganismos. Organismos pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Syntrophobacter* realizam β -oxidação e degradam compostos aromáticos sob condições anaeróbias estritas (DELFORNO et al., 2017; 2019; 2020). Além disso, participam do sintrofismo com arqueias metanogênicas, formando ácido acético pela via Wood-Ljungdahl (ESTEVE-NUNEZ, CABALLERO, e RAMOS 2001; SCHUCHMANN e MÜLLER 2014). *Syntrophobacter* oxidam lactato e propionato usando fumarato como receptor de elétrons (DELFORNO et al., 2019; 2020).

Microrganismos pertencentes a *Acidovorax* oxidam AOV e compostos aromáticos halogenados em condições anóxicas, como monoclorobenzeno (BALCKE et al. 2004; HEYLEN et al. 2006). Este gênero foi observado com maior abundância relativa na biomassa exposta ao DCF (0,28%), em comparação ao exposto a IBU (0,04%). Por fim, os gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfobulbus* incluem bactérias estritamente anaeróbias, que utilizam fumarato e etanol como doadores de elétrons, convertendo em ácido acético (LAANBROEK et al., 1984; GU e MITCHELL, 2006; DELFORNO et al., 2019; 2020). O favorecimento de tais microrganismos pela presença de etanol como cossustrato foi relatado em estudos anteriores (NAGPAL et al., 2000; MOTTERAN et al., 2018).

Em relação ao Domínio Archaea, o Filo de maior abundância relativa, em ambos os ensaios, foi Euryarchaeota (90% e 95% para lodo de DE e IE, respectivamente), que inclui todos os microrganismos metanogênicos (LI et al., 2013). O gênero *Methanosaeta* pertence a tal Filo, e foi identificado com maior abundância relativa em DE (79,26%) e IE (86,28%) (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Abundância relativa dos gêneros identificados do Domínio Archaea nos reatores em bateladas contendo etanol e diclofenaco (DE) (A) e etanol e ibuprofeno (IE) (B).



Fonte: Autora.

DE: $43,2 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1}$ + Etanol*; **IE:** $43,4 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1}$ + Etanol*; *200 mgDQO L^{-1} ; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Representantes do gênero *Methanosaeta* são metanogênicas acetoclásticas estritas, e a principal atividade enzimática realizada por tais arqueias é a fosforilação do acetato por meio da enzima acetato quinase (GUO et al., 2015). Dessa forma, *Methanosaeta* realiza sintrofismo com os gêneros identificados do Domínio Bacteria no presente estudo, como *Smithella*, *Syntrophus*, *Clostridium*, *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas* e *Geobacter*, devido ao fornecimento de acetato proveniente do metabolismo dessas bactérias (STAMS et al., 2012; SCHUCHMANN e MÜLLER, 2014; DELFORNO et al., 2019; 2020). A presença de ácido acético oriundo da degradação do cossustrato etanol também pode ter contribuído para maior abundância relativa deste gênero.

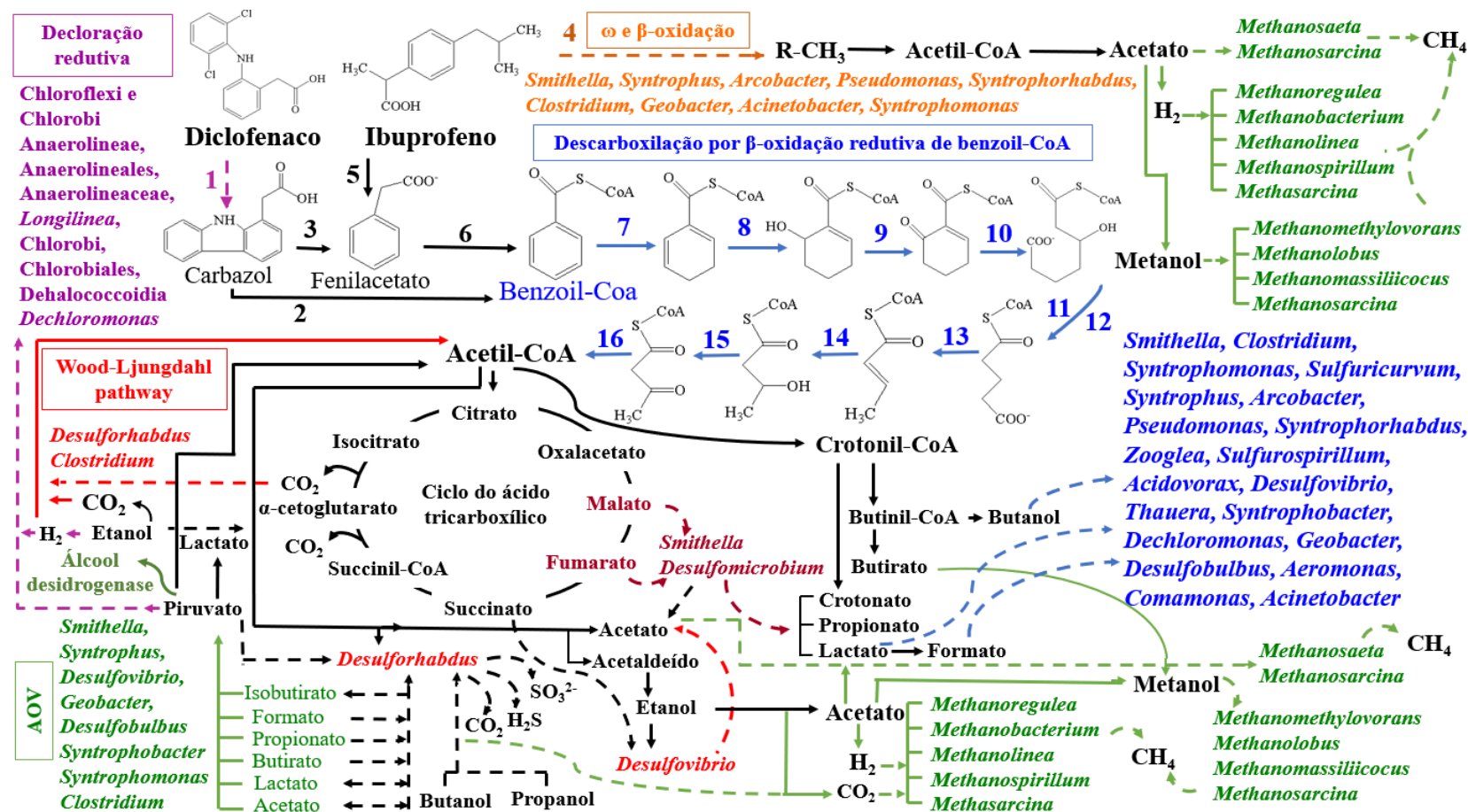
As hidrolases, enzimas liberadas principalmente durante a etapa de hidrólise da digestão anaeróbia, podem ser responsáveis pelo passo inicial da degradação cometabólica de compostos recalcitrantes, incluindo DCF (KRAH et al., 2016). Para os passos acetogênicos e metanogênicos, a remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como DCF e IBU, tem sido associada à fermentação metanogênica (TRABLY et al., 2003; Gonzalez-Gil et al., 2017; GONZALEZ-GIL et al., 2018). A acetato quinase é uma enzima relativamente específica, mas, além do acetato, é capaz de fosforilar outros substratos em menor grau, como grupos carboxila (propionato e butirato), álcoois (etanol) e grupos hidrofóbicos (formiato, glicerol, glicina, ácido glicólico) (ACETI e FERRY, 1988; IYER e FERRY, 2005). Por essa razão, DCF e IBU, que são compostos aromáticos relativamente pequenos, também podem ser biotransformados por meio da acetato quinase (GONZALEZ-GIL et al., 2017).

Além de arqueias, a acetato quinase foi purificada a partir de bactérias, como *Clostridium* e *Desulfovibrio* (MANNENS et al., 1988; DIEZ-GONZALEZ et al., 1997; WINZER et al., 1997; YU et al., 2001). Tais gêneros foram identificados em ambas as biomassas do presente estudo (Figura 5.7). Além de *Clostridium* e *Desulfovibrio*, os outros principais gêneros identificados foram *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Syntrophomonas* e *Syntrophus*, que também são bactérias capazes de metabolizar AOV, como propionato e butirato (Figura 5.7). De acordo com Schomburg et al., (2017), a acetato quinase catalisa reações do propionato como substrato, mas de forma mais lenta em comparação ao acetato. O acetato pode ser convertido no intermediário metabólico acetil-CoA, acoplando a acetato quinase com fosfato acetiltransferase. Tanto essa enzima, quanto a propionato quinase, desempenham papel importante na produção de propionato (SCHOMBURG et al., 2017). Dessa forma, durante a metabolização de ácidos graxos, primeiramente, ocorre a ativação de um derivado de HS-CoA, que então é desidrogenado para formação de enoil-CoA. Após a adição de água, ocorre segunda desidrogenação e formação de cetoacylacetil-CoA que, após hidrólise, forma acetil-CoA e acil-CoA. Finalmente, tais compostos entram no ciclo de desidrogenação e clivagem de acetil-CoA (STAMS et al., 2012). A maioria das populações de bactérias que metabolizam ácidos graxos também são capazes de fermentar o crotonato, um intermediário da síntese e degradação de acetato (STAMS et al., 2012). Além disso, quando ATP suficiente está disponível no meio (por exemplo, empregando etanol como doador de elétrons), a fosforilação da acetato quinase é favorecida em compostos de restrição estérica, como DCF e IBU (GONZALEZ-GIL et al., 2017).

Dentre os gêneros de arqueias identificados em DE e IE com abundâncias relativas inferiores a 8% (Figura 5.8), tem-se *Methanoregula*, *Methanobacterium*, *Methanolinea* e *Methanospirillum*. Tais arqueias são metanogênicas hidrogenotróficas que podem reduzir o CO₂ para CH₄ com o H₂ como doador de elétrons (LIU e WHITMAN 2008; YAMAMOTO et al. 2014; GUO et al. 2015). *Methanomethylovorans*, *Methanolobus* e *Methanomassiliicoccus* são metanogênicos metilotróficos capazes de utilizar compostos metilados (C₁), como metilamina e metanol, como fonte de carbono e energia para formação de CH₄ e CO₂ (JIANG et al. 2005; LIU e WHITMAN 2008; NKAMGA e DRANCOURT 2016). Representantes do gênero *Methanosarcina* por sua vez, podem utilizar tanto metilamina, metanol, H₂ e CO₂, como também acetato para produção de metano (LIU e WHITMAN, 2008). A menor abundância relativa de tais gêneros em comparação a *Methanosaeta* ocorreu devido ao acúmulo de certos metabólitos, como o acetato oriundo do cossustrato etanol, que favoreceu o desenvolvimento de *Methanosaeta* em detrimento das outras arqueias. Isso porque *Methanosaeta* é especialista na utilização de acetato; seu K_s (*half saturation coefficient*) para acetato é menor em relação a outras acetoclásticas, como a *Methanosarcina* (SPEECE, 1983).

A degradação de compostos recalcitrantes, como DCF e IBU e outros compostos do esgoto sanitário, é um processo complexo que requer várias interações microbianas, em que produtos de degradação de compostos mais complexos são convertidos em moléculas usadas por outros microrganismos de maneira sintrófica. A partir dos microrganismos caracterizados no presente estudo, e da literatura disponível, foi possível correlacionar vias metabólicas importantes envolvidas na digestão anaeróbia com as possivelmente envolvidas no processo da degradação anaeróbia de DCF e IBU (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Diagrama metabólico das possíveis rotas de degradação de DCF e IBU e interações microbianas anaeróbias em esgoto sanitário com etanol como cossubstrato.



As setas contínuas indicam vias metabólicas de degradação de acordo com a literatura. As setas tracejadas indicam caminhos de degradação e produção de compostos de acordo com a capacidade metabólica dos microrganismos identificados no presente estudo. Os microrganismos identificados relacionados a capacidade metabólica de realizar as etapas de degradação e produção de compostos descritos na figura estão destacados com cores diferentes

Fonte: Autora.

A descloração redutiva, passo inicial da degradação anaeróbia do DCF (GHATTAS, et al., 2017), ocorre por meio da remoção de um átomo cloro e substituição por um átomo de hidrogênio. Esta reação se torna mais fácil de ocorrer com número crescente de halogênios ligados a anéis aromáticos (VOGEL, CRIDDLE, & MCCARTY, 1987; HOLLIGER et al., 1992), como é o caso do DCF (Figura 5.9-1). Durante a digestão anaeróbia, a matéria orgânica é fermentada, formando H_2 e AOV de baixo peso molecular. Estes ácidos de cadeia curta podem fornecer carbono para os microrganismos anaeróbios responsáveis pela descloração redutiva, tais como representantes dos Filos Chloroflexi e Chlorobi identificados no presente estudo (Figura 5.9-1).

O H_2 também pode atuar como doador de elétrons, enquanto o composto orgânico clorado a ser reduzido, como o DCF, atua como receptor de elétrons. De acordo com os produtos intermediários da transformação via fotólise de DCF, propostos por Leydy et al., (2019) e Keen et al., (2013), há formação de uma série de compostos nos quais o carbazol é a unidade básica dos subprodutos gerados. Portanto, espera-se que após a descloração redutiva de DCF, o principal subproduto gerado seja o carbazol (Figura 5.9-1). O carbazol contém um grupo anilina, que pode permanecer estável devido ao par de elétrons deslocalizados. Entretanto, o grupo anilina pode ser carboxilado, ativado pela CoA e, em seguida, desaminado em benzoil-CoA sob condições metanogênicas (SCHNELL e SCHINK, 1991; Kalyuzhnyi et al., 2000) (Figura 5.9-2). Além disso, após a descloração redutiva pode ocorrer também a descarboxilação do ácido carboxílico fenilacetato (Figura 5.9-3) (GHATTAS et al., 2017).

A cadeia alquil do IBU pode ser encurtada por meio de ω e β -oxidação (Figura 5.9-2) para formação de um grupo de fenilacetato (Figura 5.9-4). Este mesmo mecanismo foi relatado para outros compostos que também contém cadeia alquil ligadas a anel aromático, como o surfactante LAS (LARA-MARTÍN et al. 2010; MOTTERAN et al. 2018). De acordo com Szabó et al., (2011), durante a degradação de IBU via fotólise, ocorre a descarboxilação do grupo fenilacetato formado (Figura 5.9-5). Na ausência de oxigênio, os ácidos fenil carboxílicos podem ser descarboxilados redutivamente por β -oxidação análoga ao do benzoil-CoA (Figura 5.9-6), que é o intermediário central mais comum na degradação anaeróbia de anéis aromáticos (FUCHS, BOLL, e HEIDER 2011; GHATTAS et al. 2017).

O anel aromático do benzoil-CoA é desaromatizado por meio da enzima benzoil-CoA redutase em condições redutoras (Figura 5.9-7), antes de ocorrer uma oxidação modificada por meio da enzima ciclohexadienil-CoA hidratase (Figura 5.9-8). Posteriormente, a porção álcool é oxidada pela hidroxenoil-CoA desidrogenase (Figura 5.9-9) e a ligação dupla $C=C$ que sobrou

é hidratada pela oxoenil-CoA hidrolase de abertura de anel (Figura 5.9-10) (HARWOOD et al., 1999; WISCHGOLL et al., 2005). A 2-hidroxi-pentil-CoA resultante sofre β -oxidação pela 3-hidroxi-pemil-CoA desidrogenase (Figura 5.9-11) e β -cetopimeil-CoA-tiolase (Figura 5.9-12), produzindo glutaril-CoA. A glutaril-CoA é oxidada e descarboxilada pela glutaril-CoA desidrogenase e glutaconil-CoA descarboxilase, respectivamente (Figura 5.9-13). Posteriormente, é hidratada pela 3-hidroxi-acil-CoA desidratase (Figura 5.9-14), oxidada pela acetoacil-CoA redutase (Figura 5.9-15) e, eventualmente, clivada pela β -cetotiolase (Figura 5.9-16). No final do processo, é formado duas moléculas de acetil-CoA (HARWOOD & GIBSON, 1997; HARWOOD et al., 1999; GHATTAS et al. 2017). As demais etapas propostas na Figura 5.9 são referentes as atividades metabólicas das bactérias e arqueais identificadas na biomassa dos reatores DE e IE, e já citadas no presente estudo (Figuras 5.9).

Segundo Fuchs, Boll; Heider (2011), a quebra de anéis aromáticos por redutases benzoil-CoA é energeticamente mais favorável para microrganismos anaeróbios obrigatórios do que para anaeróbios facultativos. No presente estudo, diversos microrganismos estritamente anaeróbios e capazes de realizar a clivagem de anéis aromáticos foram identificados, tais como *Syntrophus*, *Sulfurospirillum*, *Clostridium*, *Syntrophobacter*, *Desulfovibrio* e *Desulfobulbus* (KODAMA, 2004; GARRITY, et al., 2005; DELFORNO et al., 2017; 2019; 2020). Para anaeróbios estritos utilizarem compostos aromáticos como substrato de crescimento é necessário superar a diferença energética da ressonância dos elétrons que estabiliza o anel (FUCHS, BOLL, e HEIDER 2011). Portanto, a utilização de etanol como doador de elétrons no meio pôde favorecer um ambiente altamente redutor e auxiliar na redução das moléculas de DCF e IBU em ambiente anaeróbio.

5.1.3. Potencial metanogênico e remoção de triclosan e propanolol

Na ausência de cossustratos, para $3,6 \pm 0,1$ mg L⁻¹ de TCS (T1) e de até $28,5 \pm 0,5$ mg L⁻¹ de PRO (P3), foram observados maiores potenciais metanogênicos (*P*) em relação ao Controle (Tabela 5.8). Em contraste, para maiores concentrações desses micropoluentes emergentes sem cossustratos, notou-se diminuição da produção de metano (Tabela 5.8). Os valores de *P* de T2 ($5,0 \pm 0,1$ mgTCS L⁻¹), T3 ($15,5 \pm 0,1$ mgTCS L⁻¹) e P4 ($55,0 \pm 1,3$ mgPRO L⁻¹) foram 50,5%, 98,2% e 17,7% menores que o *P* do Controle, respectivamente. Em tais condições também foi observado diminuição da eficiência de remoção de matéria orgânica, sendo de $95 \pm 1\%$, $69 \pm 3\%$, $35 \pm 5\%$ e $51 \pm 5\%$ para os ensaios Controle, T2, T3 e P4, respectivamente (Tabela 5.9). Notou-se também acúmulo dos ácidos acético, propiônico e butírico ao final dos ensaios contendo

maiores concentrações de TCS (T2 e T3) e PRO (P4) e sem cossubstratos (Figura 5.10). Em consonância, foram observadas maiores concentrações de AOV totais (mgHAC L^{-1}) e menor alcalinidade total ($\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) ao final de tais ensaios (Tabela 5.10), configurando desequilíbrio do sistema anaeróbio.

Ainda na ausência de cossubstratos, menor produção de metano foi observada para todos os ensaios contendo TCS em comparação ao PRO (Figura 5.11). Para concentração semelhante de TCS ($5,0 \pm 0,1 \text{ mgTCS L}^{-1}$ em T2) e de PRO ($6,1 \pm 0,1 \text{ mgPRO L}^{-1}$ em P1) também se notou menor P na presença de TCS. Os valores de P de T2 e P1 foram de $423 \pm 18 \text{ } \mu\text{molCH}_4$ e $2.659 \pm 67 \text{ } \mu\text{molCH}_4$, respectivamente. Além disso, maior λ e menor Rm foram observados para os ensaios de TCS em comparação aos de PRO (Tabela 5.8). Sob tais condições evidenciou maior inibição da produção de metano com TCS.

Para os ensaios contendo cossubstratos observou-se que o uso de etanol (TE e PE), metanol:etanol (TM e PM) e fumarato (TF e PF) favoreceu a produção de metano (P) (Tabela 5.8) e a remoção de matéria orgânica (Tabela 5.9), quando comparado aos ensaios controles T2 e P4 sem cossubstratos. Notou-se também que, independente do micropoluente empregado, a biomassa se adaptou rapidamente aos cossubstratos, resultando em menor tempo para iniciar a produção de biogás (λ) (Tabela 5.8). Além disso, a coexistência de fonte de carbono facilmente degradável, como etanol, metanol e fumarato, resultou em maior velocidade de produção de metano (Rm) (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Parâmetros de Gompertz de potencial metanogênico para os reatores com com triclosan e propranolol.

| Condição experimental | | P (μmol) | λ (h) | Rm ($\mu\text{mol h}^{-1}$) | R^2 |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|---------------|---------------------------------|-------|
| Sem cossubstrato | Controle | 855 \pm 5 | 6 \pm 1 | 20 \pm 3 | 99 |
| | T1 | 1.450 \pm 42 | 128 \pm 3 | 106 \pm 8 | 98 |
| | T2 | 423 \pm 18 | 222 \pm 5 | 98 \pm 12 | 99 |
| | T3 | 15 \pm 1 | 558 \pm 5 | 1 \pm 1 | 98 |
| | P1 | 2.659 \pm 67 | 24 \pm 1 | 494 \pm 4 | 97 |
| | P2 | 4.324 \pm 146 | 24 \pm 1 | 278 \pm 4 | 98 |
| | P3 | 8.102 \pm 113 | 24 \pm 2 | 170 \pm 2 | 99 |
| | P4 | 704 \pm 52 | 199 \pm 3 | 93 \pm 5 | 99 |
| Com cossubstrato | T2 (controle) | 423 \pm 18 | 222 \pm 5 | 98 \pm 12 | 99 |
| | TF (Fumarato) | 2.144 \pm 45 | 52 \pm 1 | 225 \pm 8 | 99 |
| | TE (Etanol) | 2.960 \pm 185 | 31 \pm 1 | 254 \pm 9 | 97 |
| | TM (Metanol:Etanol) | 2.239 \pm 171 | 42 \pm 2 | 217 \pm 4 | 99 |
| | P4 (controle) | 704 \pm 52 | 199 \pm 3 | 93 \pm 5 | 99 |
| | PF (Fumarato) | 10.827 \pm 185 | 40 \pm 1 | 327 \pm 10 | 99 |
| | PE (Etanol) | 10.946 \pm 108 | 24 \pm 1 | 429 \pm 8 | 99 |
| | PM (Metanol:Etanol) | 10.809 \pm 210 | 30 \pm 1 | 395 \pm 6 | 98 |

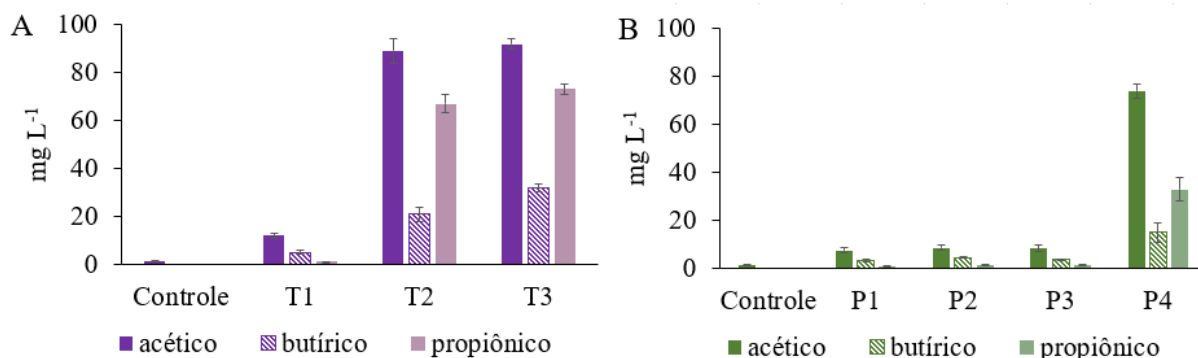
P : potencial metanogênico; λ : tempo para iniciar a produção de biogás; Rm : velocidade máxima de produção de metano; **Controle**: esgoto sanitário; **T1**: 3,6 \pm 0,1 mgTCS L⁻¹; **T2**: 5,0 \pm 0,1 mgTCS L⁻¹; **T3**: 15,5 \pm 0,1 mgTCS L⁻¹; **TF**: 5,1 \pm 0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de fumarato; **TE**: 5,1 \pm 0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de etanol; **TM**: 5,1 \pm 0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de metanol:etanol; **P1**: 6,1 \pm 0,1 mgPRO L⁻¹; **P2**: 15,3 \pm 0,2 mgPRO L⁻¹; **P3**: 28,5 \pm 0,5 mgPRO L⁻¹; **P4**: 55,0 \pm 1,3 mgPRO L⁻¹; **PF**: 55,3 \pm 0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de fumarato; **PE**: 55,9 \pm 1,2 com 200 mgDQO L⁻¹ de etanol; **PM**: 55,8 \pm 0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de metanol:etanol; **DQO**: demanda química de oxigênio.

Tabela 5.9 - Eficiência de remoção da matéria orgânica dos ensaios com triclosan e propranolol.

| Condição experimental | DQO ¹ (mg L ⁻¹) | | Remoção (%) | |
|-----------------------|--|-----------|-------------|------|
| | inicial | final | | |
| Sem cossubstrato | Controle | 563±25 | 28±1 | 95±1 |
| | T1 | 1.075±67 | 183±5 | 83±7 |
| | T2 | 1.109±12 | 344±12 | 69±3 |
| | T3 | 1.581±212 | 1.028±14 | 35±5 |
| | P1 | 1.044±76 | 73±3 | 93±1 |
| | P2 | 1.173±200 | 129±5 | 89±2 |
| | P3 | 1.556±107 | 233±5 | 85±1 |
| | P4 | 1.915±55 | 938±4 | 51±5 |
| Com cossubstrato | T2 (Controle) | 1.109±12 | 1.028±14 | 69±3 |
| | TF (Fumarato) | 1.285±61 | 218±7 | 83±1 |
| | TE (Etanol) | 1.290±85 | 77±2 | 94±2 |
| | TM (Metanol:Etanol) | 1.283±30 | 77±2 | 94±3 |
| | P4 (Controle) | 1.915±55 | 938±4 | 51±5 |
| | PF (Fumarato) | 2.107±54 | 590±5 | 72±2 |
| | PE (Etanol) | 2.187±41 | 546±4 | 75±1 |
| | PM (Metanol:Etanol) | 2.112±39 | 591±4 | 72±2 |

1 DQO: demanada química de oxigênio medida no meio; **Controle:** esgoto sanitário; **T1:** 3,6±0,1 mgTCS L⁻¹; **T2:** 5,0±0,1 mgTCS L⁻¹; **T3:** 15,5±0,1 mgTCS L⁻¹; **TF:** 5,1±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de fumarato; **TE:** 5,1±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de etanol; **TM:** 5,1±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de metanol:etanol; **P1:** 6,1±0,1 mgPRO L⁻¹; **P2:** 15,3±0,2 mgPRO L⁻¹; **P3:** 28,5±0,5 mgPRO L⁻¹; **P4:** 55,0±1,3 mgPRO L⁻¹; **PF:** 55,3±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de fumarato; **PE:** 55,9±1,2 com 200 mgDQO L⁻¹ de etanol; **PM:** 55,8±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de metanol:etanol.

Figura 5.10 - Ácidos orgânicos voláteis ao final dos ensaios com triclosan (A) e propranolol (B) sem cossubstratos.



Fonte: Autora.

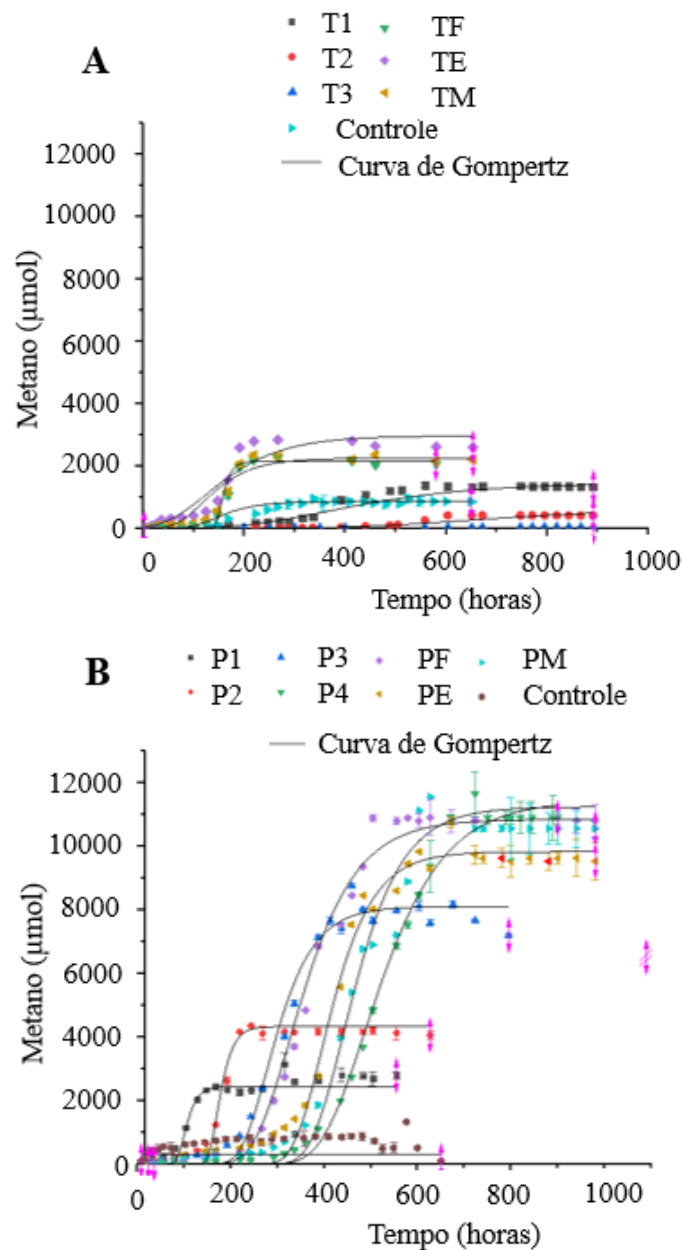
T1: 3,58±0,08 mgTCS L⁻¹; **T2:** 5,03±0,06 mgTCS L⁻¹; **T3:** 15,54±0,03 mgTCS L⁻¹; **P1:** 6,10±0,15 mgPRO L⁻¹; **P2:** 15,35±0,21 mgPRO L⁻¹; **P3:** 28,50±0,54 mgPRO L⁻¹; **P4:** 55,05±1,30 mgPRO L⁻¹.

Tabela 5.10 - pH, alcalinidade total e ácidos orgânicos voláteis totais (AOV) dos ensaios em reatores em batelada com triclosan e propranolol.

| | pH | | Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹) | | AOV (mgHAC L ⁻¹) | |
|--------------------|-----------|-----------|---|-------------|------------------------------|--------------|
| | inicial | final | inicial | final | inicial | final |
| Controle | 6,71±0,32 | 7,02±0,53 | 98,45±0,57 | 125,3±24,77 | 59,21±0,25 | 103,63±60,63 |
| Propranolol | | | | | | |
| P1 | 6,71±0,03 | 7,71±0,10 | 115±0,31 | 208±1,41 | 24±0,4 | 24±1,23 |
| P2 | 6,76±0,04 | 7,51±0,09 | 117±1,6 | 171±0,49 | 27±1,80 | 16±0,61 |
| P3 | 6,78±0,15 | 7,55±0,06 | 114±0,38 | 106±0,69 | 19±0,61 | 0,08±1,24 |
| P4 | 7,57±0,54 | 7,70±0,08 | 106±0,08 | 73±1,27 | 23±1,98 | 28±0,71 |
| PF | 7,18±0,97 | 7,26±1,01 | 430±2,19 | 568±0,23 | 212±4,17 | 173±1,38 |
| PE | 7,29±0,21 | 6,87±0,03 | 104±0,71 | 166±0,96 | 38±1,72 | 18±0,18 |
| PM | 7,25±1,01 | 7,60±0,08 | 110±1,69 | 150±1,82 | 5,30±0,01 | 2,83±0,01 |
| Triclosan | | | | | | |
| T1 | 6,85±0,04 | 7,44±0,20 | 106±0,08 | 216±1,77 | 31±0,02 | 26±0,56 |
| T2 | 6,85±0,10 | 7,70±0,11 | 106±1,08 | 95±0,22 | 31±0,02 | 92±0,13 |
| T3 | 6,85±0,11 | 7,28±0,51 | 106±0,03 | 77±1,38 | 31±0,15 | 188±1,32 |
| TF | 6,75±0,06 | 7,71±0,02 | 113±0,01 | 203±1,40 | 26±1,21 | 26±0,24 |
| TE | 6,89±0,03 | 7,71±0,04 | 113±0,92 | 204±0,32 | 18±1,73 | 10±0,43 |
| TM | 6,74±0,51 | 7,75±0,12 | 114±0,38 | 212±0,62 | 17±0,49 | 11±0,13 |

Controle: esgoto sanitário; **T1:** 3,6±0,1 mgTCS L⁻¹; **T2:** 5,0±0,1 mgTCS L⁻¹; **T3:** 15,5±0,1 mgTCS L⁻¹; **TF:** 5,1±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de fumarato; **TE:** 5,1±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de etanol; **TM:** 5,1±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de metanol:etanol; **P1:** 6,1±0,1 mgPRO L⁻¹; **P2:** 15,3±0,2 mgPRO L⁻¹; **P3:** 28,5±0,5 mgPRO L⁻¹; **P4:** 55,0±1,3 mgPRO L⁻¹; **PF:** 55,3±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de fumarato; **PE:** 55,9±1,2 com 200 mgDQO L⁻¹ de etanol; **PM:** 55,8±0,1 com 200 mgDQO L⁻¹ de metanol:etanol; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Figura 5.11 - Produção de metano dos reatores em bateladas contendo triclosan (A) e propranolol (B).



Fonte: Autora.

Controle: esgoto sanitário; **T1:** $3,58 \pm 0,08$ mgTCS L⁻¹; **T2:** $5,03 \pm 0,06$ mgTCS L⁻¹; **T3:** $15,54 \pm 0,03$ mgTCS L⁻¹; **TF:** $5,10 \pm 0,04$ mgTCS L⁻¹ + Fumarato*; **TE:** $5,12 \pm 0,71$ mgTCS L⁻¹ + Etanol*; **TM:** $5,19 \pm 0,53$ mgTCS L⁻¹ + Metanol:Etanol*; **P1:** $6,10 \pm 0,15$ mgPRO L⁻¹; **P2:** $15,35 \pm 0,21$ mgPRO L⁻¹; **P3:** $28,50 \pm 0,54$ mgPRO L⁻¹; **P4:** $55,05 \pm 1,30$ mgPRO L⁻¹; **PF:** $55,32 \pm 0,91$ mgPRO L⁻¹ + Fumarato*; **PE:** $55,84 \pm 1,23$ mgPRO L⁻¹ + Etanol*; **PM:** $55,78 \pm 0,04$ mgPRO L⁻¹ + Metanol:Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Postula-se que a inibição de TCS em comparação ao PRO seja relacionada as diferentes propriedades físico-químicas dos compostos. O coeficiente de partição octanol-água (Log Kow)

do TCS (4,35) é maior quando comparado ao PRO (3,5) e, para o primeiro micropoluinte, tem-se maior adsorção a biomassa microbiana. Conseqüentemente, menor concentração de TCS é necessária para ocasionar toxicidade à comunidade microbiana. A tendência de adsorção na biomassa também foi utilizada para explicar a ação inibitória de outros micropoluentes (FOUNTOULAKIS et al. 2004; WHITMAN, BOWEN, e BOONE 2006). Kayembe et al. (2013), por exemplo, avaliaram a toxicidade de compostos fenólicos em teste de potencial metanogênico e observaram relação entre hidrofobicidade e toxicidade de compostos aromáticos. Quanto mais hidrofóbica é a molécula (como é o caso do TCS em comparação ao PRO), maior é a sua permeabilidade na membrana celular e, conseqüentemente, maior sua toxicidade (KAYEMBE et al. 2013). De fato, no presente estudo, para concentração semelhante dos contaminantes, a adsorção de TCS ($5,0 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) em T2 foi de $21,1 \pm 0,7\%$, enquanto em P1 a adsorção de PRO ($6,1 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) foi de $1,6 \pm 0,5\%$. Além disso, para todas as condições, foi observada maior adsorção de TCS em comparação ao PRO (Tabela 5.11). A adsorção de PRO ficou abaixo de 2% para todas as concentrações testadas, enquanto a adsorção mínima de TCS foi $20,1 \pm 0,2\%$ em T1 ($3,6 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabela 5.11 - Remoção, adsorção e degradação de triclosan e propranolol em reatores em batelada.

| Condição experimental | | inicial (mg L^{-1}) | Remoção (%) | Adsorção (%) | Degradação (%) | |
|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|--|
| Triclosan | | | | | | |
| Sem cossubst. | T1 | $3,6 \pm 0,1$ | $67,0 \pm 0,3$ | $20,1 \pm 0,2$ | $45,1 \pm 0,8$ | |
| | T2 | $5,0 \pm 0,1$ | $59,1 \pm 0,7$ | $21,0 \pm 0,7$ | $38,1 \pm 1,2$ | |
| | T3 | $15,5 \pm 0,1$ | $80,01 \pm 1,0$ | $77,1 \pm 1,3$ | $3,0 \pm 0,6$ | |
| | Propranolol | | | | | |
| | P1 | $6,1 \pm 0,1$ | $58,0 \pm 0,9$ | $1,6 \pm 0,5$ | $56,4 \pm 0,4$ | |
| | P2 | $15,3 \pm 0,2$ | $85,1 \pm 0,1$ | $1,5 \pm 1,2$ | $80,2 \pm 0,7$ | |
| | P3 | $28,5 \pm 0,5$ | $89,1 \pm 0,1$ | $1,6 \pm 0,7$ | $88,4 \pm 0,9$ | |
| Com cossubst. | Triclosan | | | | | |
| | T2 (Controle) | $5,0 \pm 0,1$ | $59,1 \pm 0,7$ | $21,0 \pm 0,7$ | $38,1 \pm 1,2$ | |
| | TF (Fumarato) | $5,1 \pm 0,1$ | $78,2 \pm 0,5$ | $24,0 \pm 1,6$ | $54,0 \pm 0,3$ | |
| | TE (Etanol) | $5,1 \pm 0,1$ | $93,7 \pm 0,8$ | $16,0 \pm 0,2$ | $77,1 \pm 0,1$ | |
| | TM (Metanol:Etanol) | $5,1 \pm 0,1$ | $83,1 \pm 0,9$ | $18,1 \pm 1,1$ | $65,1 \pm 1,3$ | |
| | Propranolol | | | | | |
| | P4 (Controle) | $55,0 \pm 1,3$ | $9,02 \pm 0,47$ | $1,9 \pm 2,6$ | $7,1 \pm 0,1$ | |
| PF (Fumarato) | $55,3 \pm 0,1$ | $11,03 \pm 0,2$ | $1,9 \pm 1,2$ | $10,4 \pm 0,1$ | | |
| PE (Etanol) | $55,9 \pm 1,2$ | $26,61 \pm 0,8$ | $1,7 \pm 0,3$ | $24,1 \pm 0,1$ | | |
| PM (Metanol:Etanol) | $55,8 \pm 0,1$ | $15,24 \pm 0,7$ | $1,6 \pm 0,3$ | $13,0 \pm 1,2$ | | |

Fumarato, etanol e metanol:etanol: 200 mg L^{-1} de demanda química de oxigênio.

A maior toxicidade de TCS também pode estar relacionada à formação de subprodutos oriundos de sua degradação, que podem ser ainda mais tóxicos que o composto original (BUTH et al. 2010; TOHIDI e CAI 2017). Entretanto, no presente estudo, dentre todos os ensaios com TCS, menor P ($15 \pm 1 \mu\text{molCH}_4$) e menor remoção de matéria orgânica ($35 \pm 5\%$) foram observados em T3. Em tal ensaio, $77,1 \pm 1,3\%$ da massa de TCS ($15,5 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) ficou adsorvida na biomassa. Portanto, a toxicidade a comunidade microbiana ocasionada por TCS em T3 ocorreu, provavelmente, devido a molécula original.

Outra diferença observada entre os micropoluentes emergentes foi que a degradação de TCS foi menor em função do aumento de sua concentração (Tabela 5.11), sendo de $45,1 \pm 0,8\%$ em T1 ($3,6 \pm 0,1 \text{ mgTCS L}^{-1}$) para $3,0 \pm 0,6\%$ em T3 ($15,5 \pm 0,1 \text{ mgTCS L}^{-1}$). A degradação de PRO, por outro lado, foi maior proporcionalmente ao aumento de sua concentração em até $28,5 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 5), sendo de $56,4 \pm 0,4\%$ em P1 ($6,1 \pm 0,1 \text{ mgPRO L}^{-1}$) e $88,4 \pm 0,9\%$ em P3 ($28,5 \pm 0,5 \text{ mgPRO L}^{-1}$). Todavia, para maior concentração aplicada em P4 ($55,0 \pm 1,3 \text{ mgPRO L}^{-1}$) notou-se menor degradação ($7,1 \pm 0,1\%$).

Provavelmente, estes resultados estão relacionados a biodisponibilidade dos compostos-alvos até limiar específicos que não ocorra inibição do processo anaeróbio. Por exemplo, aumentar a biodisponibilidade de micropoluentes recalcitrantes pode favorecer fenômenos cometabólicos e, conseqüentemente, aumentar a eficiência de sua remoção (STASINAKIS et al., 2012). Entretanto, a degradação anaeróbia de compostos tóxicos ocorre em concentrações limiars específicas. Isto é, ao mesmo tempo que baixa biodisponibilidade pode limitar a degradação, como o caso de éteres difenílicos polibrominados, por outro lado, para outros compostos tóxicos, como o caso do surfactante LAS, a elevada biodisponibilidade pode resultar em inibição microbiana (STASINAKIS et al., 2012). Este fato pode ter ocorrido no presente estudo e, provavelmente, $28,5 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de PRO (P3) em 2 gSTV L^{-1} pode ter favorecido a degradação do fármaco devido ao aumento de sua biodisponibilidade e favorecimento de fenômenos cometabólicos a partir da matéria orgânica que constitui esgoto sanitário. Entretanto, para maior concentração, ou seja, $55,0 \pm 1,3 \text{ mgPRO L}^{-1}$ em 2 gSTV L^{-1} (P4), a degradação do fármaco foi inibida devido a toxicidade a comunidade microbiana. Para o TCS esse limiar de concentração foi menor; ou seja, $5,0 \pm 0,1 \text{ mgTCS L}^{-1}$ em 2 gSTV L^{-1} (T2) ocasionou em toxicidade a comunidade microbiana e menor degradação do bactericida.

O fármaco PRO, sendo um composto anfifílico, pode atuar nas membranas celulares microbianas e causar alterações na organização das bicamadas lipídicas, resultando em rupturas

de membranas celulares (FOUNTOULAKIS et al., 2004; 2008), enquanto que o bactericida TCS pode inibir a síntese de ácidos graxos das células (MCNAMARA, LAPARA, e NOVAK 2014; CAREY et al. 2016). Tais mecanismos de toxicidade podem estar relacionados a menor eficiência de remoção de matéria orgânica, menor degradação dos micropoluentes e menores valores de P observados nos ensaios contendo maiores concentrações de TCS (T2 e T3) e PRO (P4) (Tabelas 5.8, 5.9 e 5.11), o que corrobora com o acúmulo de AOV em tais ensaios (Figura 5.10).

Entretanto, a comunidade microbiana anaeróbia pode desenvolver resistência ao TCS quando exposta a baixas concentrações deste bactericida (MCNAMARA, LAPARA, e NOVAK 2014; CAREY et al. 2016). Por exemplo, Fan et al., (2020) relataram que $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ de TCS ($100 \text{ mgTCS KgSTV}^{-1}$) estimula a transcrição de genes codificadores das principais enzimas envolvidas no processo de acidogênese, como BK (que transforma produtos hidrolisados em ácido butírico) e OAATC (vital no processo de produção de ácido propiônico). Tais processos podem ter ocorrido no presente estudo, uma vez que para menor concentração de TCS (T1) e PRO (P1, P2 e P3), além de maior P , notou-se maiores λ e Rm em comparação ao Controle com esgoto sanitário e sem os micropoluentes emergentes e os cossustratos (Tabela 5.8). Estes resultados configuram o desenvolvimento de atividades metabólicas, resultando em uma fase de atraso para produção de biogás (λ) e posterior aumento de Rm e P . O maior P para menor concentração de TCS (T1) e PRO (P1, P2 e P3), em comparação ao Controle (com esgoto sanitário e sem os micropoluentes emergentes os cossustratos), também pode estar relacionado a maior concentração de matéria orgânica inicial nesses ensaios (Tabela 5.11), que ocorreu devido ao acréscimo dos compostos, atuando como fonte de carbono e energia para os microrganismos. Durante a digestão anaeróbia, o aumento da matéria orgânica pode resultar em aumento da produção de metano, mesmo na presença de micropoluentes emergentes (ESPOSITO et al. 2012), como TCS e PRO. Além disso, a remoção de matéria orgânica nos ensaios T1, P1, P2 e P3 foram próximas ao Controle (com esgoto sanitário e sem os micropoluentes emergentes os cossustratos), sendo de $83\pm 7\%$, $93\pm 1\%$, $89\pm 2\%$, $85\pm 1\%$ e $95\pm 1\%$, respectivamente.

Entre os cossustratos, foi observado maiores valores de P e Rm empregando etanol, seguido de metanol:etanol em comparação ao fumarato (Tabela 5.8). Este fato pode estar relacionado ao maior valor de λ nos ensaios com fumarato (Tabela 5.8). Em condição anaeróbia, fumarato pode ser convertido em malato, oxaloacetato, piruvato, succinato e acetato (STAMS, 1994; KUO et al., 2018; MOTTERAN et al., 2020). Dessa forma, fumarato contribui para o metabolismo microbiano em vias distintas de obtenção de energia, o que justifica o maior P nos

ensaios contendo fumarato em relação a ausência de cossustrato e presença de TCS e PRO. Todavia, o fumarato deve passar por diferentes rotas metabólicas antes de ser convertido em acetato e H_2 (STAMS, 1994; KUO et al., 2018; MOTTERAN et al., 2020), que são utilizados pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, respectivamente. Dessa forma, o processo para produção de metano utilizando fumarato como cossustrato se torna mais lento em comparação ao uso de etanol e metanol. Tais álcoois podem fornecer acetato para arqueias metanogênicas acetoclásticas, o que justifica o menor λ e maior R_m observados na presença de etanol e metanol:etanol.

Entretanto, assim como fumarato, o metanol também pode passar por diferentes conversões metabólicas que, apesar de envolver produção direta a metano ou conversão em acetato, também pode ocorrer produção de butirato (FLORENCIO; FIELD; LETTINGA, 1995). A partir do metanol, pode-se ocorrer a ativação do butirato em butiril-CoA, convertendo-o em 2 acetil-CoA por meio de duas etapas de oxidação, sendo um acetil-CoA utilizado para a ativação do butirato e outro para produzir ATP na conversão em acetato (STAMS, 1994; STAMS et al., 2012; SCHOMBURG et al., 2017). Sob tais condições, parte do ATP formado é utilizado para oxidar o butiril-CoA, e é necessário o sintrofismo com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas para a retirada de H_2 do meio para que ocorra a mineralização completa do butirato. Além disso, nesta rota, o NADH formado a partir da oxidação de 3-hidroxi-butilil-CoA em acetoacetil-CoA também pode ser utilizado para reduzir o crotonil-CoA em butiril-CoA (STAMS, 1994; STAMS et al., 2012; SCHOMBURG et al., 2017).

Na rota do etanol, por outro lado, o acetato é formado diretamente a partir de sua oxidação e a quantidade de energia que pode ser conservada por metanogênicas acetoclásticas não depende da concentração de H_2 no meio. Para essas metanogênicas, o acetato é ativado pela acetil-CoA que é clivada em metil e carbonil que são, subsequentemente, reduzidos a metano e oxidados a CO_2 (STAMS, 1994; STAMS et al., 2012; SCHOMBURG et al., 2017). Segundo Kotsyurbenko et al., (2004), a contribuição para produção de metano por meio de acetato como substrato é superior a 67%, enquanto para H_2/CO_2 , a contribuição é inferior a 33%, o que justifica o maior P e maior R_m na presença de etanol em comparação ao metanol:etanol e fumarato.

Nos ensaios de PRO, observou-se que o emprego dos cossustratos não interferiu na adsorção do fármaco. Para todas as condições testadas, a adsorção de PRO foi inferior a 2% (Tabela 4). Para o TCS, por outro lado, menor adsorção foi observada empregando etanol (TE:

16,0±0,2%), seguido de metanol:etanol (TM: 18,1±1,1%). Todavia, maior adsorção de TCS foi observada usando fumarato (TF: 24,0±1,6%) em comparação a ausência de cossustrato (T2: 21,0±0,7%).

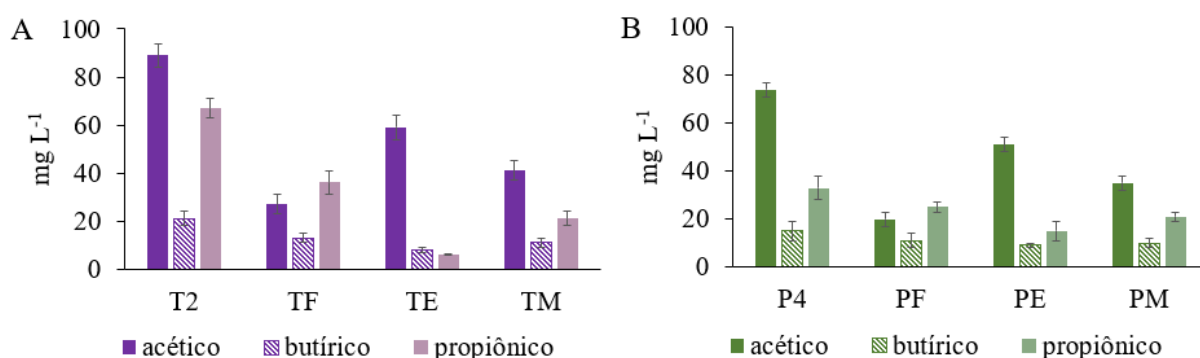
A utilização dos cossustratos também resultou em maior degradação de TCS e PRO (Tabela 5.11). Maior degradação foi observada empregando etanol, seguido de metanol:etanol e fumarato. Para TCS, a degradação aumentou de 38,1±1,2% no controle T2 para 77,1±0,1% utilizando etanol (TE). Para os ensaios contendo PRO, a mesma tendência foi observada. No controle P4, a degradação de PRO foi de 7,1±0,1%, enquanto no ensaio contendo etanol (PE) aumentou para 24,1±0,1%.

Os diferentes valores de adsorção obtidos para TCS e PRO na presença dos cossustratos, também podem ser explicados pelas suas propriedades físico-químicas. Os valores de coeficientes de distribuição água-sólido (K_d) e de Log K_{ow} de produtos farmacêuticos hidrofílicos e anfílicos, assim como seus potenciais de sorção em biossólidos, geralmente, não são alterados sob diferentes condições anaeróbias, tais como alteração de pH, condições mesofílica, termofílica e pré-tratamento alcalino ou térmico (STASINAKIS et al., 2012; MCCURRY et al., 2014; MALMBORG e MAGNÉR, 2015). Este fato pode justificar o porquê da presença dos cossustratos não ter alterado a adsorção do fármaco anfílico PRO no lodo anaeróbio do presente estudo. O TCS, por outro lado, assim como seus produtos de degradação, são propensos a particionar no lodo devido às suas características hidrofóbicas (TOHIDI e CAI, 2017). Entretanto, no presente estudo, notou-se menor adsorção de TCS nos ensaios contendo etanol e metanol:etanol (Tabela 5.11). Dessa forma, o emprego desses cossustratos contribuiu para a diminuição dos efeitos tóxicos de TCS sobre as células microbianas e, conseqüentemente, resultou em maior produção de metano (P), maior remoção de matéria orgânica e maior degradação de TCS.

O aumento da remoção de TCS e de PRO na presença de etanol também pode estar relacionado a indução do cometabolismo. Álcoois de cadeia curta, como o etanol, são fontes de carbono e energia, podendo auxiliar na reativação da atividade bacteriana e degradação de compostos recalcitrantes, tais como surfactante LAS (MOTTERAN et al., 2018). Inclusive, foi relatado que a degradação anaeróbia de TCS é favorecida quando condições metanogênicas são estimuladas utilizando acetato como cossustrato (VEETIL et al., 2012; STASINAKIS et al., 2012). Isto pode ter ocorrido no presente estudo devido a formação direta de acetato a partir do etanol. De fato, foi observado maior concentração de ácido acético ao final dos ensaios

contendo etanol em comparação aos demais cossustratos (Figura 5.12). Além disso, de forma geral, notou-se menores concentrações de AOV ao final dos ensaios contendo cossustratos em relação aos ensaios controles (Figura 5.12). Este fato indica a utilização dos AOV por bactérias homoacetogênicas e arqueias metanogênicas, o que corrobora com o maior potencial metanogênico obtido empregando etanol, metanol:etanol e fumarato em relação a ausência desses cossustratos.

Figura 5.12 - Ácidos orgânicos voláteis ao final dos ensaios contendo triclosan (A) e propranolol (B) na ausência de cossustratos (T2 e P4) e presença dos cossustratos fumarato (TF e PF), etanol (TE e PE) e metanol:etanol (TM e PM).



Fonte: Autora.

T2: $5,03 \pm 0,06$ mgTCS L⁻¹; **TF:** $5,10 \pm 0,04$ mgTCS L⁻¹ + Fumarato*; **TE:** $5,12 \pm 0,71$ mgTCS L⁻¹ + Etanol*; **TM:** $5,19 \pm 0,53$ mgTCS L⁻¹ + Metanol:Etanol*; **P4:** $55,05 \pm 1,30$ mgPRO L⁻¹; **PF:** $55,32 \pm 0,91$ mgPRO L⁻¹ + Fumarato*; **PE:** $55,84 \pm 1,23$ mgPRO L⁻¹ + Etanol*; **PM:** $55,78 \pm 0,04$ mgPRO L⁻¹ + Metanol:Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio.

Portanto, devido a maior degradação obtida de TCS em codigestão com etanol ($77,1 \pm 0,1\%$) e de PRO sem o uso de cossustratos ($88,4 \pm 0,9\%$), foi realizado a caracterização taxonômica da biomassa microbiana dos ensaios de TE ($5,1 \pm 0,7$ mgTCS L⁻¹ com 200 mgDQO L⁻¹ de etanol) e P3 ($28,5 \pm 0,5$ mgPRO L⁻¹).

5.1.3.1. Diversidade microbiana dos reatores de maior remoção de triclosan e propranolol

Em ambas as biomassas, a cobertura de Good (Tabela 5.12) para os Domínios Bacteria e Archaea foi superior a 99%, indicando alta cobertura das amostras. Além disso, por meio das curvas de rarefação (Figura 5.13) foi observado platô, com representação satisfatória das populações microbianas. As sequências do Domínio Bacteria de TE (76447) e P3 (77794) foram agrupadas em 166 e 165 OTUs, respectivamente. Para o Domínio Archaea, as sequências de TE (88129) e de P3 (124164) foram agrupadas em 10 OTUs.

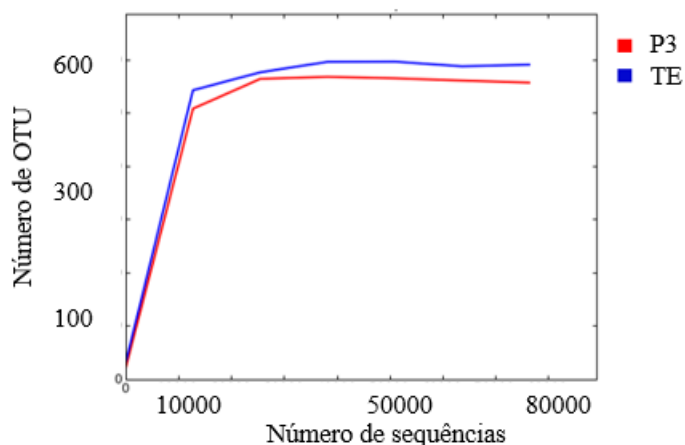
Nos dois níveis taxonômicos analisados, foram observados maiores valores dos índices de riqueza (Chao-1) e diversidade (Shannon H) para a biomassa de TE em comparação a P3 (Tabela 5.12). Este fato é resultado da maior toxicidade exercida na comunidade microbiana de TCS em comparação ao PRO, bem como o uso de etanol como cossubstrato em TE. Aumentar a toxicidade do meio diminui a dominância de populações microbianas e aumenta a diversidade de microrganismos (GIBSON e S. HARWOOD 2002; ZHAO et al. 2016; MOTTERAN et al., 2018). Além disso, etanol é fonte de carbono para os microrganismos e influencia diretamente no aumento da diversidade microbiana (MOTTERAN et al., 2018).

Tabela 5.12 - Índices ecológicos dos Domínios Bacteria e Archaea dos ensaios de reatores em bateladas de maior remoção de triclosan (TE) utilizando etanol e propranolol (P3) na ausência de cossubstrato.

| Índices | Domínio Bacteria | | Domínio Archaea | |
|---------------|------------------|--------|-----------------|-------|
| | TE | P3 | TE | P3 |
| Good coverage | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Shannon H | 7,80 | 5,20 | 0,23 | 0,27 |
| Chao 1 | 590,00 | 555,00 | 10,00 | 10,00 |
| Dominance | 0,16 | 0,74 | 0,91 | 0,89 |

TE: 5,12±0,71 mgTCS L⁻¹ + Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio; **P3:** 28,50±0,54 mgPRO L⁻¹.

Figura 5.13 - Curva de rarefação dos ensaios de reatores em bateladas de maior remoção de triclosan (TE) utilizando etanol e propranolol (P3) na ausência de cossubstrato.



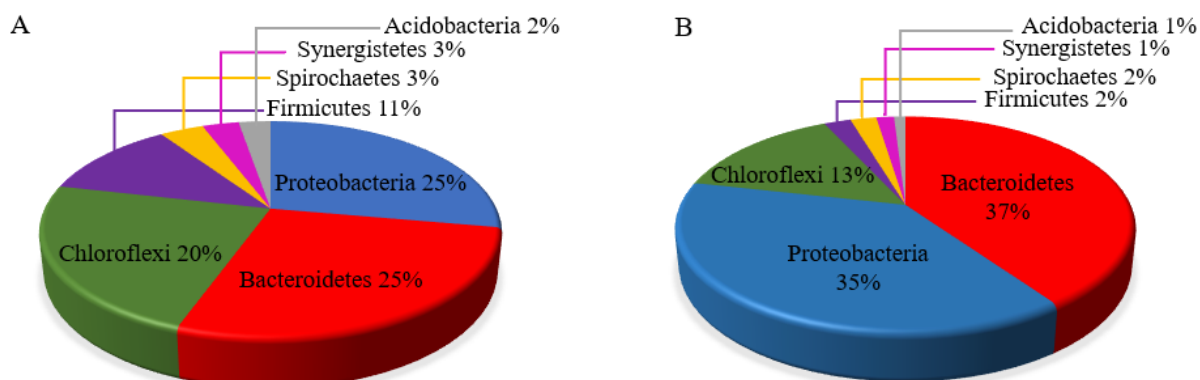
Fonte: Autora.

TE: 5,12±0,71 mgTCS L⁻¹ + Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio; **P3:** 28,50±0,54 mgPRO L⁻¹.

Em relação ao Domínio Bacteria, foram identificados nas biomassas de TE e P3 o total de 38 e 37 filos, respectivamente. Maior abundância relativa dos Filos Proteobacteria e

Bacteroidetes foi observada em ambas as biomassas (Figura 5.14). Membros destes Filos são frequentemente identificados em populações microbianas prevalentes em reatores anaeróbios com esgoto sanitário (CYDZIK-KWIATKOWSKA e ZIELIŃSKA, 2016; GRANATTO et al., 2019), pois possuem ampla diversidade metabólica, relacionada a utilização de proteínas e carboidratos (GUPTA, 2000; THOMAS et al., 2011). O terceiro Filo de maior abundância relativa em TE e P3 foi Chloroflexi (Figura 5.14). Membros deste filo utilizam variedade de poluentes persistentes como receptores de elétrons e participam da degradação de compostos halogenados (KRZMARZICK et al., 2012). O TCS, como composto organoclorado, pode servir como receptor de elétrons para bactérias desalogenadoras, tais como membros do Filo Chloroflexi, durante a descloração reductiva. Além disso, bactérias desalogenadoras podem ser enriquecidas em ambientes contendo TCS devido a tolerância desses microrganismos a poluentes clorados (KRZMARZICK et al., 2012; MCNAMARA e KRZMARZICK, 2013). De fato, no presente estudo, notou-se maior abundância relativa de Chloroflexi em TE (20%) em comparação a P3 (13%).

Figura 5.14 - Abundância relativa dos Filos do Domínio Bacteria na biomassa ao final da operação dos reatores em bateladas contendo triclosan e etanol (A) e propranolol (B).



Fonte: Autora.

TE: 5,12±0,71 mgTCS L⁻¹ + Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio; **P3:** 28,50±0,54 mgPRO L⁻¹.

Em relação aos gêneros do Domínio Bacteria, notou-se que em TE, a abundância relativa dos 22 gêneros mais abundantes foi entre 0,3% e 4,1% (Figura 5.15-A). Em P3, por outro lado, foi observado abundância relativa de 18,0% para *VadinBC27_wastewater-sludge_group*. Os demais gêneros identificados em P3 foram observados com abundância relativa inferior a 3,7%.

Informações limitadas foram relatadas sobre as funções metabólicas de microrganismos pertencentes ao gênero *VadinBC27*. Organismos semelhantes a tal gênero foram identificados pela primeira vez em 1997 em biomassa de reator anaeróbico alimentado com vinhaça, e receberam nome genérico de *VADIN* (*vinasses anaerobic digester of Narbonne*) (GODON et al., 1997). *VadinBC27* pertence ao Filo Bacteroidetes e Família Rikenellaceae. Membros desta Família são anaeróbios estritos, fermentadores de proteína e carboidratos e produzem acetato, H₂ e CO₂ (SU et al., 2014). *VadinBC27* também foram identificados em reatores anaeróbios com águas residuárias contendo compostos tóxicos e recalcitrantes, como éteres difenólicos polibromados e contaminantes orgânicos oriundos de lixiviados de aterros sanitários (XU et al., 2012; XIE et al., 2014).

Os gêneros *Christensenellaceae_R-7_group*, *Smithella* e *Pseudomonas* foram identificados com abundâncias relativas acima de 2%, em TE e P3 (Figura 5.15-A). *Christensenellaceae_R-7_group* pertence ao Filo Firmicutes e Família Christensenellaceae. Membros desta Família são estritamente anaeróbios, fermentadores e produzem principalmente ácido acético (MOROTOMI et al., 2012). Representantes do gênero *Christensenellaceae_R-7_group* foram identificados como predominantes em reatores anaeróbios com águas residuárias contendo compostos tóxicos, tais como giberelina (hormônio produzido por vegetais), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (OUYANG et al., 2019; TANG et al., 2019), além de sulfato e amônio. *Smithella* e *Pseudomonas* são anaeróbios facultativos, capazes de realizar clivagem de anéis aromáticos, ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e oxidar propionato, crotonato, butirato, malato e fumarato em acetato, podendo assim realizar sintrofismo com arqueias metanogênicas (DE BOK et al. 2001; KERTESZ et al., 1994; BRENNER et al., 2005). Além disso, a partir de cepas de *Pseudomonas* isoladas de solo, foi relatado que organismos semelhantes a tal gênero expressam altos níveis de resistência ao TCS, como aumento da expressão do gene *mexB* (componente da bomba de efluxo MexAB-OprM) que também codifica resistência a antibióticos (YAZDANKHAH et al., 2006; MCNAMARA et al., 2014). Desta forma, os principais gêneros identificados no presente estudo são resistentes a compostos tóxicos, como TCS e PRO, e por isso apresentaram maior abundância relativa em detrimento aos demais.

Em relação aos demais gêneros, foram identificados 11 deles com abundância relativa acima de 0,10% em ambos os reatores (Figura 5.15). Dentre tais gêneros, *Petrimonas* foi identificado em maior abundância relativa em PRO (3,7%) em comparação ao TCS (1,3%). Representantes de tal gênero são bactérias fermentativas e anaeróbias estritas, capazes de oxidar

ácidos graxos e produzir acetato, H₂ e CO₂ (GRABOWSKI, 2005). Trata-se também de microbiota específica que utiliza enxofre e nitrato como receptores de elétrons, reduzindo a sulfeto e amônio, respectivamente (BRENNER et al., 2005; GRABOWSKI, 2005; IKEGAM et al., 2018). Em relação a biomassa exposta ao TCS, notou-se maior abundância relativa (Figura 5-A) e maior número de OTU (Figura 5.15-B) de *Longilinea*, *Arcobacter*, *Mesotoga* e *Sulfuricurvum* em comparação a biomassa exposta ao PRO. Tratam-se de microrganismos relacionados as vias metabólicas de organoclorados e podem ter sido enriquecidos na presença de TCS.

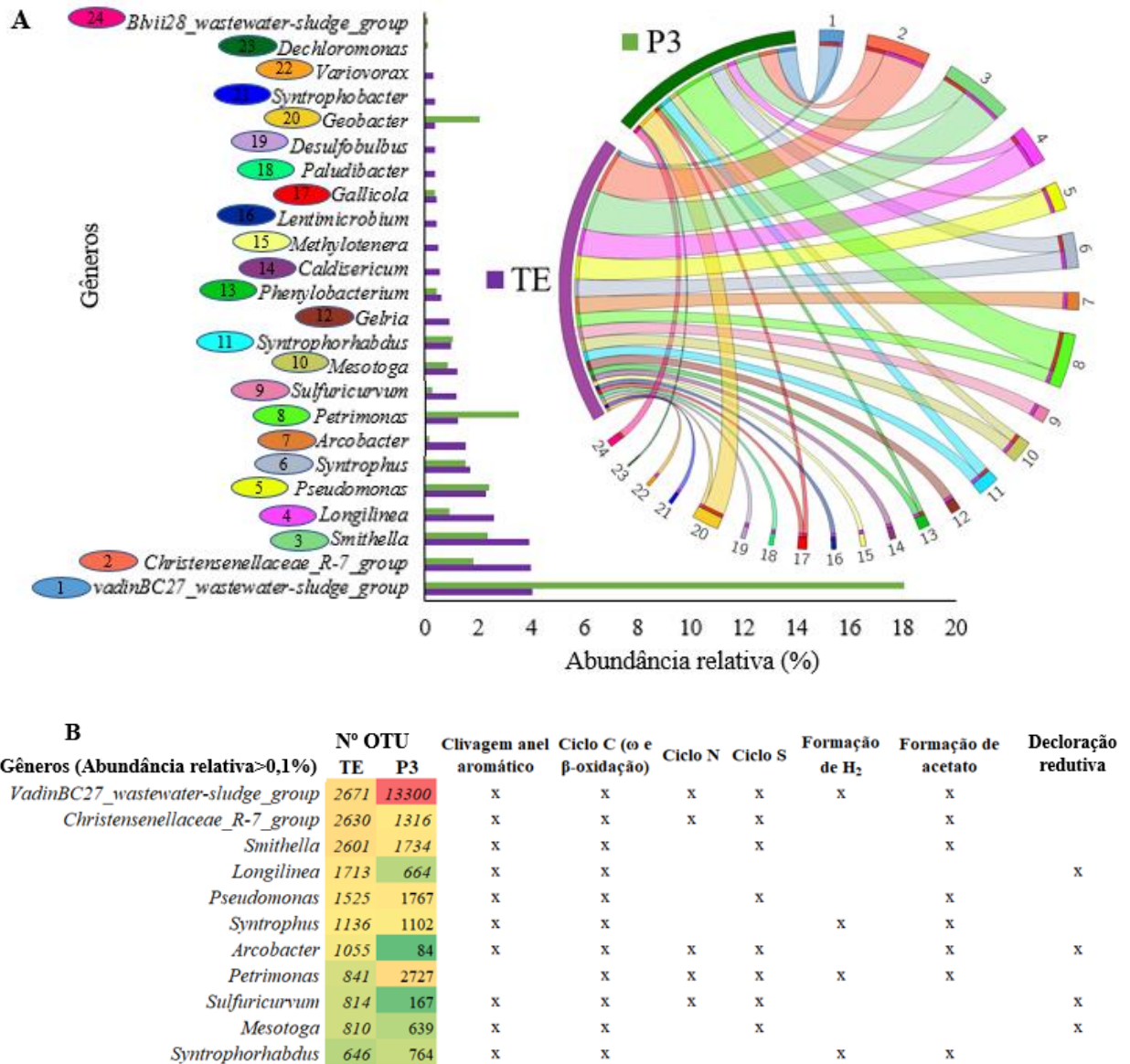
Microrganismos semelhantes a *Longilinea* pertencem ao Filo Chloroflexi e também foram identificados em sedimentos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos contendo cloro (YAMADA e SEKIGUCHI, 2018). A abundância relativa de *Longilinea* foi de 2,6% e 0,9% em TE e P3, respectivamente. Para o gênero *Arcobacter*, foi observada abundância relativa de 1,6% e 0,1% em TE e P3, respectivamente. Microrganismos pertencentes a tal gênero são anaeróbios facultativos e possuem capacidade de degradar compostos aromáticos, além de utilizar N₂, nitrato e enxofre como receptores finais de elétrons (WAHLUND e MADIGAN, 1993; HOUF, 2005). Algumas bactérias semelhantes a *Arcobacter* são fermentativas e podem produzir acetato e realizar sintrofismo com arqueias metanogênicas acetocláticas (DONACHIE, 2005; HOUF, 2005; MADIGAN et al., 2017).

Mesotoga, por sua vez, são anaeróbios estritos e fazem parte do ciclo do enxofre. Diversas cepas de tal gênero foram isoladas a partir de culturas enriquecidas com organoclorados, tais como tetraclorobifenil e dechlorinante policlorada, sendo relacionadas a degradação de compostos aromáticos clorados (PULLIAM HOLOMAN et al., 1998; NESBØ et al., 2012; ZHAXYBAYEVA et al., 2012). Além disso, a partir da análise da composição de aminoácidos das proteínas de *Mesotoga*, foi relatada a capacidade específica de tal gênero de realizar transferência horizontal de genes redutores da dehalogenase (enzima essencial para descloração redutiva). Este fato indica que a presença de microrganismos pertencentes a *Mesotoga* são essenciais para que o consórcio anaeróbio seja capaz de realizar descloração redutiva em organoclorados (ZHAXYBAYEVA et al., 2012), como o TCS. No presente estudo, *Mesotoga* foi identificado com abundância relativa maior em TE (1,2%) quando comparado a P3 (0,9%). Maior abundância relativa de *Sulfuricurvum* também foi observado em TE (1,2%) em relação a P3 (0,2%). Microrganismos pertencentes a tal gênero são também quimioautotrófico, sendo capazes de utilizar vários compostos de enxofre e nitrato como doadores de elétrons. Além disso, incluem organismos capazes de degradar compostos

orgânicos tóxicos e clorados, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenil policlorado e 4-clorofenol (HAN et al., 2012; LIU et al., 2018; LI et al., 2019).

Em relação aos gêneros *Syntrophus* e *Syntrophorhabdus*, observou-se abundâncias relativas e números de OTU semelhantes em TE e P3 (Figura 5.15). Tratam-se de microrganismos de ampla capacidade metabólica, podendo utilizar TCS e PRO, bem como demais compostos aromáticos presentes em esgoto sanitário (GRANATTO et al., 2019) como substrato de crescimento. Representantes do gênero *Syntrophus*, por exemplo, são anaeróbios estritos e possuem mecanismos para realizar clivagem de anéis aromáticos sob condições anaeróbias, β -oxidação e degradar cadeias de ácidos graxos em relações sintróficas com arqueias metanogênicas (BOLL, 2005; BRENNER et al., 2005). A abundância relativa de *Syntrophus* foi de 1,7% e 1,5% em TE e P3, respectivamente. Representantes do gênero *Syntrophorhabdus*, por sua vez, foram observados com abundâncias relativas de 1,0% em TE e P3. Tais microrganismos pertencem ao Filo Proteobacteria e utilizam compostos aromáticos como doadores de elétrons em condições anaeróbias, podendo assim também realizar sintrofismo com arqueias acetoclásticas e hidrogenotróficas (QIU et al., 2008; KUEVER, 2014).

Figura 5.15 - A: Gêneros de abundância relativa maior que 0,1% do Domínio Bacteria identificados na biomassa microbiana ao final da operação dos reatores contendo TCS e etanol (TE) e PRO (P3). B: Principais atividades metabólicas exercidas pelos microrganismos pertencentes aos gêneros identificados com abundância relativa maior que 0,1% do Domínio Bacteria.



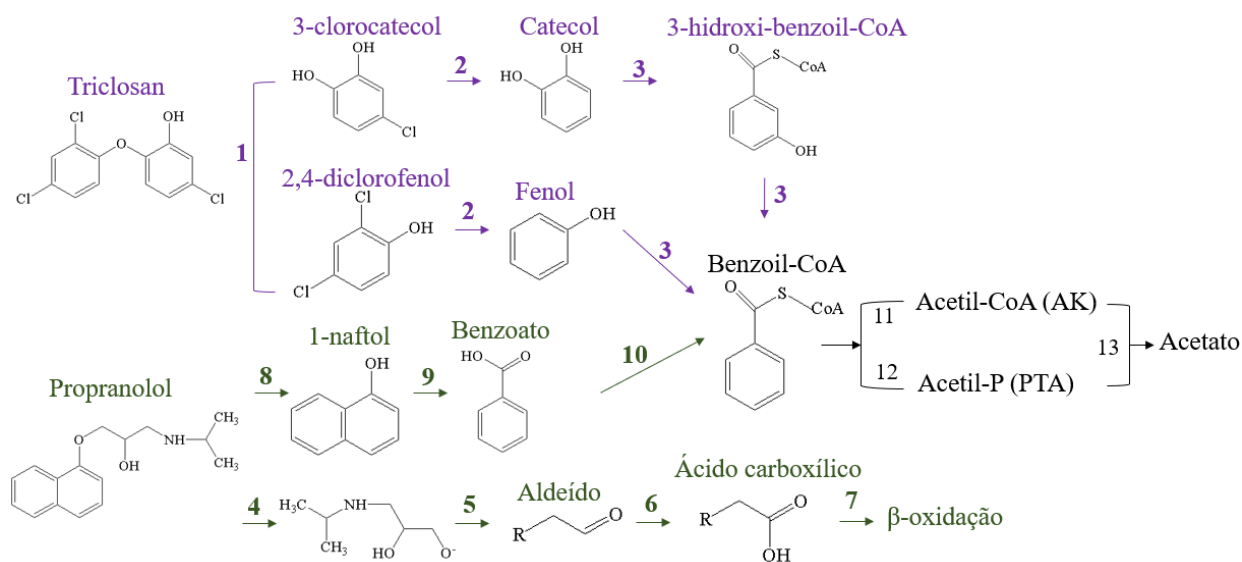
Fonte: Autora.

TE: 5,12±0,71 mgTCS L⁻¹ + Etanol*; *200 mgDQO L⁻¹; **DQO:** demanda química de oxigênio; **P3:** 28,50±0,54 mgPRO L⁻¹. **B:** escala de cor: vermelho maior valor, amarelo valor intermediário e verde menor valor.

A partir da caracterização microbiana e da literatura disponível, foi possível correlacionar as atividades metabólicas exercidas pelos principais gêneros bacterianos

identificados em TE e P3 (Figura 5.15-B) com as possivelmente envolvidas no processo de degradação anaeróbica de TCS e PRO (Figura 5.16).

Figura 5.16 - Vias da degradação de triclosan e propranolol baseadas em Veetil et al., (2012) e García-Espinoza e Mijaylova Nacheva, (2019), respectivamente.



Fonte: Autora.

A degradação anaeróbica de TCS pode ocorrer por várias vias metabólicas, que incluem desalogenação, hidroxilação e metilação (FAN et al., 2020). Veetil et al., (2012) relataram a degradação de TCS sob condições redutoras de sulfato e, principalmente, sob condições metanogênicas. Inicialmente, o TCS é transformado em 2,4-diclorofenol e clorocatecol por meio da clivagem da ligação éter difenílico (Figura 5.16-1) (VEETIL et al., 2012; FAN et al., 2020). Esta reação prossegue via O-desmetilação do grupo metil pelo sistema enzimático O-desmetilase (GHATTAS et al., 2017). Posteriormente, ocorre a descloração redutiva (Figura 5.16-2). Esta reação, sob condições anaeróbicas, ocorre prontamente se houver mais de dois halogênios presentes e, principalmente, se ligados a sistema aromático (GHATTAS et al., 2017), como é o caso do TCS. As dioxigenases e monooxigenase são possivelmente as principais enzimas envolvidas no processo (VEETIL et al., 2012). Como consequência desta reação, é formado fenol e catecol (VEETIL et al., 2012) e, após ativação da Coenzima A (Figura 5.16-3), ocorre a redução do anel aromático (GHATTAS et al., 2017).

Em relação ao PRO, sua rota de degradação via oxidação eletroquímica foi proposta por García-Espinoza e Mijaylova Nacheva, (2019). Segundo tais autores, inicialmente há quebra da ligação éter por ataque de radicais livres. Em meio biológico, como no presente estudo, a quebra

desta ligação pode ser mais difícil, uma vez que a ligação éter é bastante inerte. Entretanto, a remoção de ésteres metílicos de benzoatos e benzenos foi demonstrada em vários estudos sob condições acetoclásticas e fermentativas (GHATTAS et al., 2017), que pode proceder via O-desmetilação, assim como explicado para o TCS. Após a quebra da ligação éter, segundo García-Espinoza and Mijaylova Nacheva, (2019), os radicais atacam a ligação C5 da estrutura cíclica dupla de PRO com liberação da cadeia lateral formando um grupo amina (Figura 5.16-4). Existem poucos relatos sobre degradação anaeróbia de amina, entretanto, a desaminação sob condições redutoras de nitrato foi observada em cultura pura (NGUYEN et al., 2008). Após a desaminação, espera-se que seja formado um aldeído (Figura 5.16-5), que pode ser oxidado a ácido carboxílico por microrganismos anaeróbios (Figura 5.16-6) e, finalmente, ser mineralizado via β -oxidação (Figura 5.16-7) (GHATTAS et al., 2017). Além da formação do grupo amina, durante o passo inicial da degradação de PRO, segundo García-Espinoza e Mijaylova Nacheva, (2019), há formação de 1-naftol (Figura 5.16-8). Diversos compostos intermediários oriundos de 1-naftol foram relatados por García-Espinoza e Mijaylova Nacheva, (2019) durante a oxidação eletroquímica de PRO, devido ao ataque de radicais livres. Entretanto, sob condições metanogênicas, como no presente estudo, e sob condições redutoras de sulfato, a transformação de naftalenos ocorre diretamente via mecanismos de carboxilação e são convertidos diretamente a benzoato (Figura 5.16-9) (GHATTAS et al., 2017). Posteriormente, por meio da ativação da Coenzima A, ocorre a formação do benzoil-CoA (Figura 5.16-10), assim como na via de degradação do TCS.

Benzoil-CoA é o intermediário central mais comum durante a degradação anaeróbia de anéis aromáticos, e pode ser desaromatizado via descarboxilação por meio de β -oxidação redutiva, formando acetil-CoA (FUCHS, BOLL, e HEIDER 2011; GHATTAS et al., 2017). A formação de acetil-CoA é realizada pela fosforilação para acetil-fosfato por meio da enzima acetato quinase (AK) (Figura 5.16-11). Em seguida, o acetil-fosfato é convertido em acetil-CoA pela fosfotransacetilase (PTA) (Figura 5.16-12) (GORRELL e FERRY, 2007). Quando AK e PTA estão associadas, a reação inversa (conversão de acetil-CoA em acetato) é catalisada (Figura 5.16-13) (FERRY, 2011). Posteriormente, ocorre a produção de metano por arqueias metanogênicas.

Em relação ao Domínio Archaea foi observado dominância do Filo Euryarchaeota em ambas as amostras de biomassa microbiana (TE e P3), com abundâncias relativas acima de 97%. Tal Filo inclui todos os microrganismos metanogênicos (LI et al., 2013). Em relação aos gêneros, em P3 notou-se abundância relativa de 46% e 42% para *Methanobacterium* e

Methanosaeta, respectivamente, enquanto em TE foi observado abundância relativa de 61% para *Methanosaeta*. Os demais gêneros de arqueias foram identificados em P3 e TE com abundâncias relativas inferiores a 7% e 8%, respectivamente (Figura 5.17).

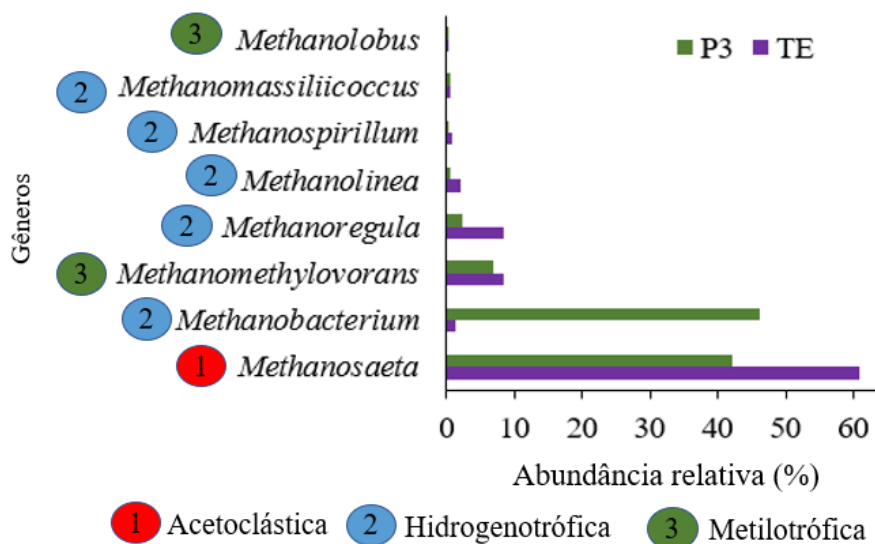
A suscetibilidade de arqueias metanogênicas para compostos que exibem mecanismos de toxicidade semelhantes ao efeito de PRO, como o surfactante LAS, foi relatada (MÖSCHE e MEYER, 2002). Entretanto, organismos semelhantes a *Methanobacterium* codificam vários genes que estão envolvidos na adaptação à estresses abióticos, como di-mio-inositol-1,1-fosfato e n-glicerol-1-fosfato (MÜLLER et al., 2005; MAUS et al., 2014). Além disso, organismos semelhantes a *Methanobacterium* também foram identificados em ambientes hostis, como em digestores anaeróbios de vinhaça, assim como o gênero *VadinBC27* do Domínio Bacteria, que foi identificado com maior abundância relativa na mesma biomassa (P3) (Figura 5.15) (GODON et al., 1997; STANTSCHIEFF et al., 2014). Estes fatos podem ter contribuído para maior abundância relativa de *Methanobacterium* em detrimento das demais arqueias expostas ao tóxico PRO em P3. Outro fator contribuinte é que organismos pertencentes a tal gênero são versáteis e podem produzir metano a partir de acetato, H₂, CO₂ e formiato. Por exemplo, *Methanobacterium* podem codificar acetil-CoA-sintetase (*acsS*) para produzir acetil-CoA a partir de acetato (MAUS et al., 2014). O grupamento de genes de acetil-CoA descarboxilase/sintase (*cdhA-E*) foi identificado em seu genoma e previsto para catalisar a síntese da acetil-CoA a partir de moléculas de um carbono (DAI et al., 1998). No genoma de tais arqueias também estão presentes genes que transportam formiato (*fdhC*) e hidrogenases (*fdhA-B*), que estão envolvidos na síntese de metano a partir do formiato como substrato metanogênico alternativo (MAUS et al., 2014).

Methanosaeta, por sua vez, foi o segundo gênero mais abundante na biomassa exposta ao PRO (P3) e dominante na biomassa exposta a etanol e TCS (TE) (Figura 5.17). Microrganismos pertencentes a tal gênero sintetizam acetil-CoA por meio da enzima AK. O primeiro passo da metanogênese realizado por tais arqueias é a fosforilação do acetato para acetil-fosfato por meio da AK (GUO et al., 2015). A maior abundância relativa de *Methanosaeta* em TE, em detrimento das demais arqueias, provavelmente, está relacionado ao fornecimento de acetato oriundo da degradação do cossustrato etanol adicionado à TE, uma vez que tais arqueias são metanogênicas acetoclásticas estritas (GUO et al., 2015). Em P3 não foi adicionado etanol como cossustrato. Todavia, *Methanosaeta* realiza sintrofismo com os principais gêneros bacterianos identificados em P3, como *VadinBC27*, *Christensenellaceae_R-7_group*, *Smithella*, *Pseudomonas*, *Syntrophus*, *Arcobacter*, *Petrimonas*, e *Syntrophorhabdus*,

devido ao fornecimento de acetato proveniente do metabolismo dessas bactérias (BOLL, 2005; BRENNER et al., 2005; GRABOWSKI, 2005; QIU et al., 2008; MOROTOMI et al., 2012; KUEVER, 2014; SU et al., 2014). Além disso, o K_s (*half saturation coefficient*) para acetato de *Methanosaeta* é menor em relação a outras arqueias (SPEECE, 1983), o que também pode ter contribuído para tal gênero ser o segundo mais abundante em P3.

Os outros gêneros do Domínio Archaea identificados em TE e P3 foram *Methanoregula*, *Methanolinea*, *Methanospirillum* e *Methanomassiliicoccus* (Figura 5.17). Tais arqueias são metanogênicas hidrogenotróficas que reduzem CO_2 para CH_4 utilizando H_2 como doador de elétrons (LIU e WHITMAN 2008; YAMAMOTO et al. 2014; GUO et al. 2015; NKAMGA e DRANCOURT 2016). As demais arqueias identificadas, como *Methanomethylovorans* e *Methanolobus*, são metilotróficas, capazes de utilizar compostos metilados para formação de CH_4 e CO_2 (JIANG et al. 2005; LIU e WHITMAN 2008; GUO et al. 2015). Arqueias metanogênicas metilotróficas são frequentemente identificadas com menor abundância relativa em lodo de reatores anaeróbico com esgoto sanitário (GUO et al. 2015; GRANATTO et al., 2019).

Figura 5.17 - Abundância relativa dos gêneros identificados do Domínio Archaea nos lodos ao final da operação dos reatores contendo TCS e etanol em TE e PRO em P3.



Fonte: Autora.

TE: $5,12 \pm 0,71$ mgTCS L^{-1} + Etanol*; *200 mgDQO L^{-1} ; **DQO:** demanda química de oxigênio; **P3:** $28,50 \pm 0,54$ mgPRO L^{-1} .

5.2. Reator EGSB em escala aumentada

5.2.1. Remoção da matéria orgânica

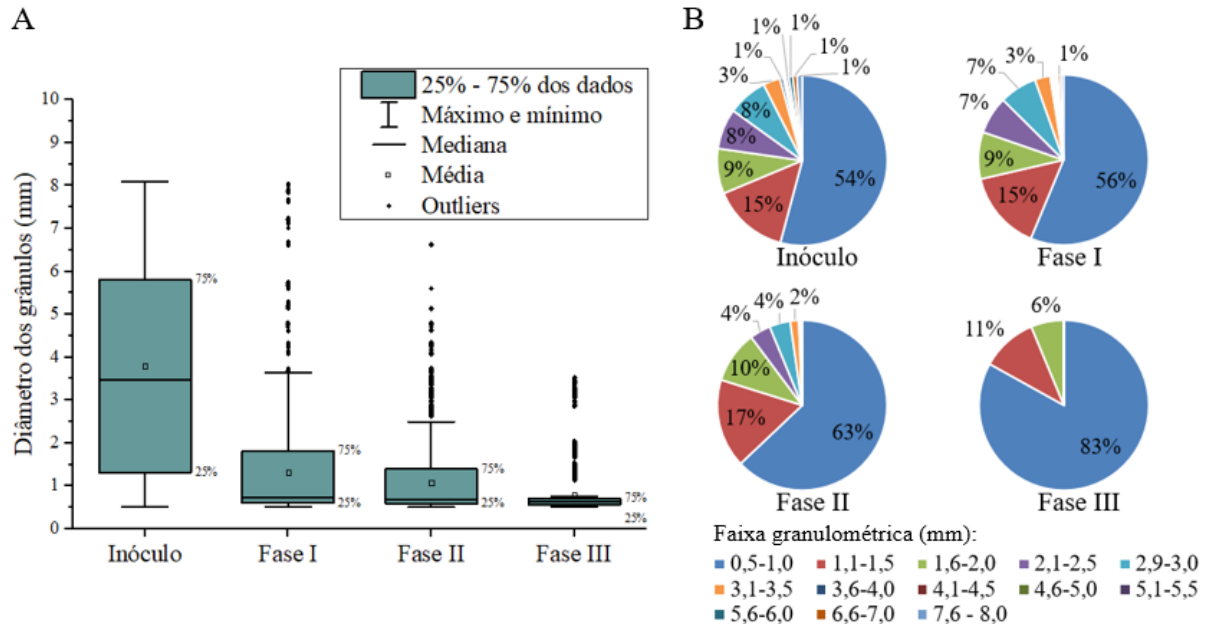
No período de adaptação do EGSB notou-se maior concentração de SST efluente do reator (Tabela 5.13), sendo de $6,77 \pm 21 \text{ mg L}^{-1}$. Para as fases I, II e III os valores de SST efluentes foram inferiores, sendo de $0,22 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$, $0,23 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,10 \pm 4,10 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Também foi observada diminuição do diâmetro dos grânulos ao longo da operação (Figura 5.18). A frequência de grânulos menores (0,5-1,0 mm) foi de 54% para o inóculo, enquanto para as fases I, II e III observou-se aumento para 56%, 63% e 83%, respectivamente.

Tabela 5.13 - Sólidos do reator EGSB.

| Sólidos dos lodos | | | | | | |
|--|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| Fase | ST (g L^{-1}) | | STV (g L^{-1}) | | STF (g L^{-1}) | |
| | Inicial | Final | Inicial | Final | Inicial | Final |
| Adaptação | $5,92 \pm 0,90$ | $4,51 \pm 1,20$ | $4,81 \pm 0,4$ | $3,92 \pm 0,05$ | $1,13 \pm 0,20$ | $0,80 \pm 0,10$ |
| Fase I | $4,51 \pm 1,20$ | $4,52 \pm 0,30$ | $3,92 \pm 0,05$ | $4,23 \pm 0,70$ | $0,80 \pm 0,10$ | $1,10 \pm 0,01$ |
| Fase II | $4,52 \pm 0,30$ | $4,21 \pm 0,50$ | $4,23 \pm 0,70$ | $3,92 \pm 0,03$ | $1,10 \pm 0,01$ | $1,20 \pm 0,01$ |
| Fase III | $4,21 \pm 0,50$ | $2,90 \pm 1,02$ | $3,92 \pm 0,03$ | $2,32 \pm 1,90$ | $1,20 \pm 0,01$ | $0,90 \pm 1,01$ |
| Sólidos efluentes | | | | | | |
| Fase | SST (mg L^{-1}) | | SSV (mg L^{-1}) | | SSF (mg L^{-1}) | |
| Adaptação | $6,77 \pm 21$ | | $6,73 \pm 21$ | | $0,05 \pm 0,05$ | |
| Fase I | $0,22 \pm 0,03$ | | $0,20 \pm 0,03$ | | $0,02 \pm 0,02$ | |
| Fase II | $0,23 \pm 0,02$ | | $0,21 \pm 0,02$ | | $0,02 \pm 0,03$ | |
| Fase III | $3,10 \pm 4,10$ | | $1,30 \pm 1,32$ | | $0,08 \pm 1,01$ | |
| Fase | Adaptação | I | II | III | | |
| Duração (dias) | 20 | 96 | 96 | 96 | | |
| TDH (horas) | 36 ± 2 | 36 ± 4 | 20 ± 2 | 20 ± 3 | | |
| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | $28 \pm 1,2$ | $27,8 \pm 3,4$ | $21,5 \pm 2,2$ | $25,7 \pm 2,2$ | | |

ST: sólidos totais; **STV:** sólidos totais voláteis; **STF:** sólidos totais fixos; **SST:** sólidos suspensos totais; **SSV:** sólidos suspensos voláteis; **SSF:** sólidos suspensos fixos; **TDH:** tempo de detenção hidráulico; **Temperatura:** medida as 12h (máxima alcançada no dia).

Figura 5.18 - A: Box Plot do diâmetro dos grânulos do lodo de inóculo e do reator EGSB para as fases I, II e III. B: Frequência (%) das faixas granulométricas (mm) observadas para o lodo de inóculo e para o lodo do reator EGSB das fases I, II e III.



Fonte: Autora.

A: As caixas de Box Plot possuem linhas inferiores de quartil (25%), linhas do meio de valores médios (50%) e linhas superiores de quartil (75%). As linhas retas (-) que se estendem de cada extremidade da caixa são para mostrar a extensão dos dados em até 1,5 vezes a faixa interquartil (IQR); **TDH:** tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

A redução do diâmetro dos grânulos ocorreu, provavelmente, devido a menor quantidade e qualidade de matéria orgânica no esgoto sanitário (de 473±179 a 815±155 mgDQO L⁻¹; Tabela 5.14) em comparação ao efluente de avicultura (2000 mgDQO L⁻¹) (DELFORNO et al., 2017) de reator UASB, ao qual o inóculo do EGSB estava adaptado. Além disso, fármacos, produtos de higiene pessoal e outros micropoluentes no esgoto sanitário (GRANATTO et al., 2019) podem desestabilizar as interações hidrofóbicas e hidrofílicas de agregados microbianos (DELFORNO et al., 2012; ALVARINO et al., 2014).

Entretanto, foi observada estabilidade reacional do sistema anaeróbio ao longo de toda operação do EGSB. O pH afluente e efluente do reator, durante as fases I, II e III, foi próximo a neutralidade (Tabela 5.14) e dentro da faixa preconizada como ideal para o processo anaeróbio estável, entre 6,5 e 8,2 (SPEECE, 1983). Também foi observada geração de alcalinidade durante toda a operação (Tabela 5.14; Figura 5.19). Além disso, observou-se relação de alcalinidade

intermediária/parcial (AI/AP) efluente de $0,39\pm 0,14$, $0,34\pm 0,11$ e $0,41\pm 0,13$ para as fases I, II e III, respectivamente. Condições de AI/AP efluente próximo a 0,3 são favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos anaeróbios (RIPLEY et al., 2014).

No tratamento preliminar da ETE de São Carlos-SP é adicionado hidróxido de cálcio, o que pode ter contribuído para o pH e alcalinidade do esgoto sanitário afluente ter sido semelhantes em todas as fases de operação do EGSB (Tabela 5.14). Ao caracterizar o esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP, Granatto et al., (2019) relataram pH e alcalinidade total semelhantes ao do presente estudo, sendo de $7,2\pm 0,1$ e 216 ± 22 mgCaCO₃ L⁻¹, respectivamente. Tais possibilidades podem ter contribuído para o sistema de tamponamento do EGSB e, conseqüentemente, para a estabilidade reacional do sistema ao longo de sua operação.

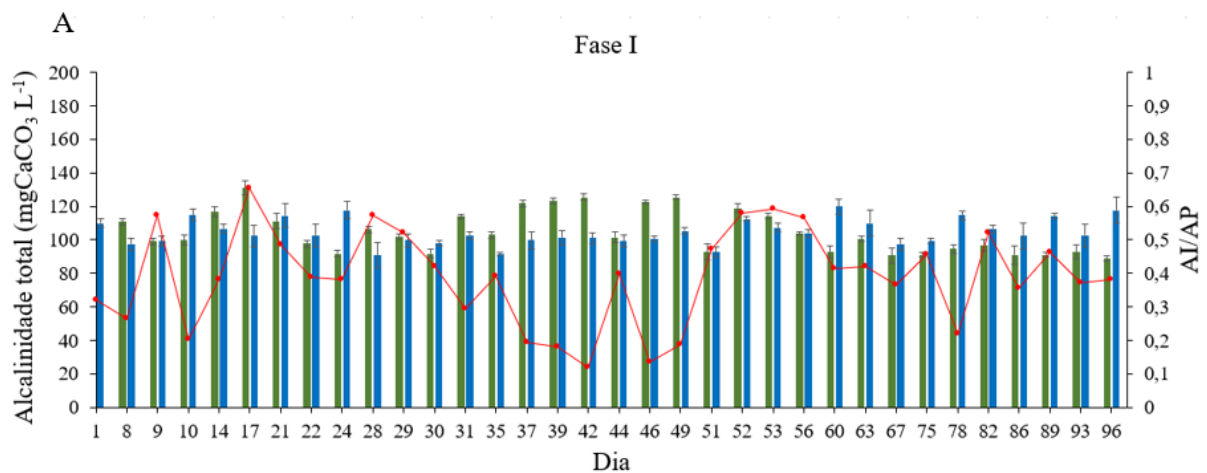
O estabelecimento do processo anaeróbio equilibrado foi confirmado pelo monitoramento de AOV. Observou-se menor concentração de AOV total efluente em comparação ao afluente (Tabela 5.14; Figura 5.20). Este fato indica o consumo de AOV gerados durante a etapa de acidogênese. Além disso, a instabilidade do processo anaeróbio foi relacionada a concentração de AOV total efluente acima de 300 mgHAc L⁻¹ (OKADA et al., 2013). Neste estudo, a maior concentração de AOV total observada foi de 50 mgHAc L⁻¹ durante a fase III.

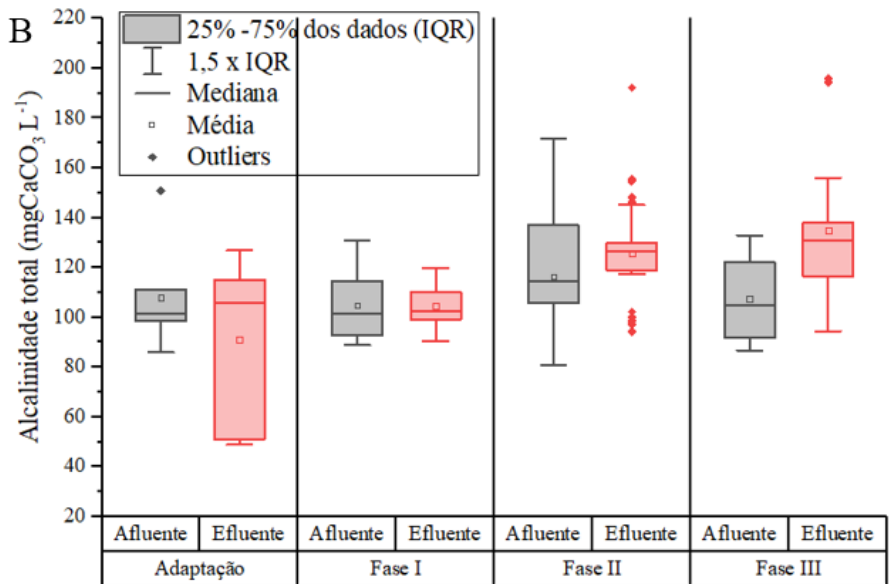
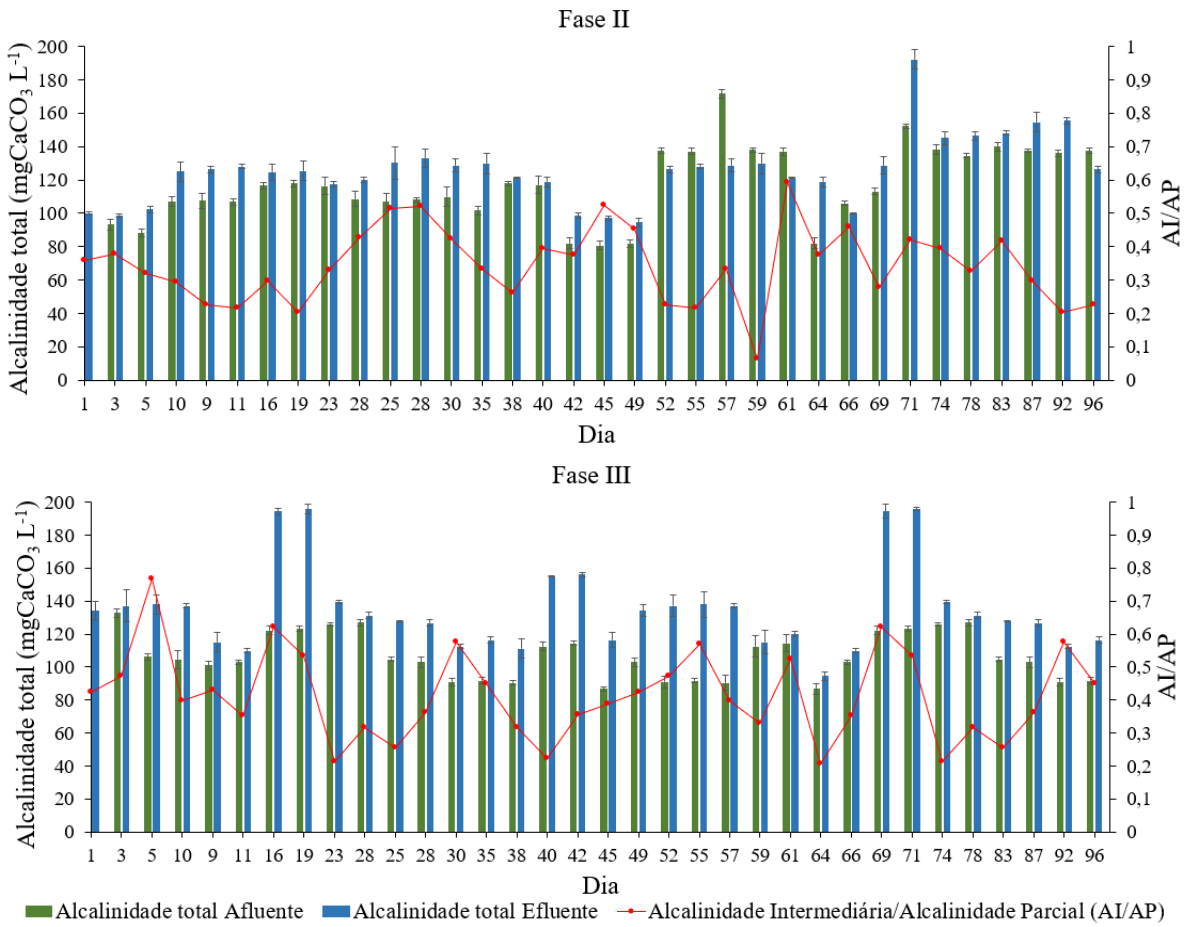
Tabela 5.14 - Parâmetros de operação do afluente e efluente do reator EGSB.

| Parâmetros | Adaptação | Fase I | Fase II | Fase III |
|---|-----------|---------|---------|----------|
| pH | | | | |
| Afluente | 7,2±0,2 | 7,4±0,2 | 7,1±0,3 | 7,1±0,2 |
| Efluente | 7,5±0,3 | 7,4±0,2 | 7,0±0,4 | 7,2±0,2 |
| Alcalinidade total | | | | |
| Afluente (mgCaCO ₃ L ⁻¹) | 108±18 | 108±12 | 137±27 | 109±15 |
| Efluente (mgCaCO ₃ L ⁻¹) | 94±27 | 103±8 | 119±12 | 113±25 |
| Alcalinidade parcial | | | | |
| Afluente (mgCaCO ₃ L ⁻¹) | 90±16 | 88±16 | 106±25 | 72±16 |
| Efluente (mgCaCO ₃ L ⁻¹) | 82±27 | 89±9 | 100±8 | 95±23 |
| Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV) | | | | |
| Afluente (mgHAc L ⁻¹) | 36±10 | 42±18 | 62±33 | 76±19 |
| Efluente (mgHAc L ⁻¹) | 24±3 | 29±9 | 37±11 | 37±11 |
| Matéria orgânica | | | | |
| DQO afluente (mg L ⁻¹) | 535±64 | 473±179 | 716±231 | 815±155 |
| DQO efluente (mg L ⁻¹) | 90±58 | 41±25 | 75±21 | 81±20 |
| COE (mg gSTV d ⁻¹) | 68±14 | 79±30 | 198±68 | 251±48 |
| Remoção (%) | 81±6 | 90±7 | 88±6 | 90±3 |
| Duração (dias) | 20 | 96 | 96 | 96 |
| TDH (horas) | 36±2 | 36±4 | 20±2 | 20±3 |

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fase III**: etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO**: demanda química de oxigênio; COE: carga orgânica específica.

Figura 5.19 - A: A: Variação temporal da alcalinidade total efluente e afluente ao reator EGSB e relação entre alcalinidade intermediária e parcial (AI/AP). B: Box Plot da alcalinidade total efluente e afluente ao reator EGSB.

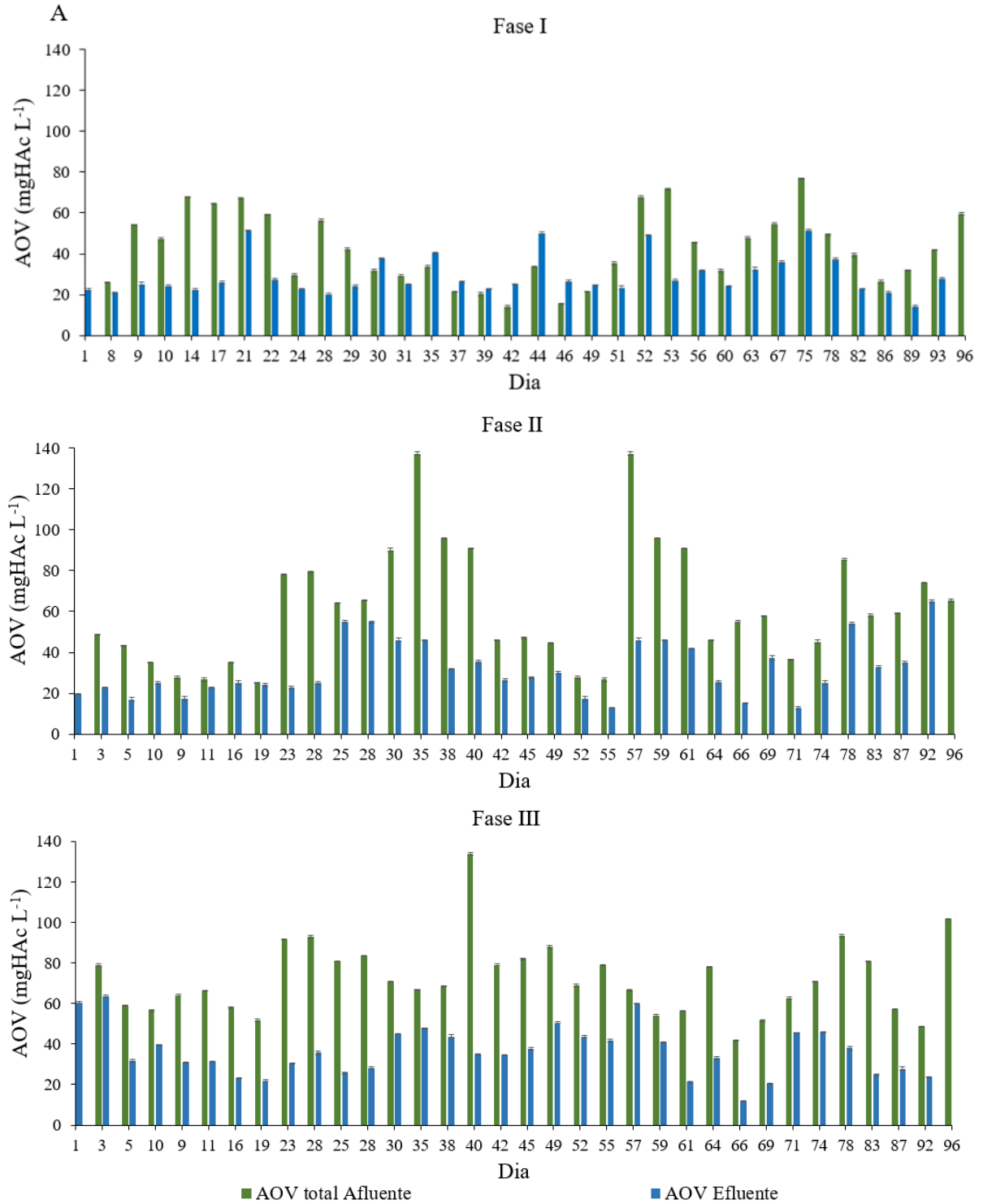


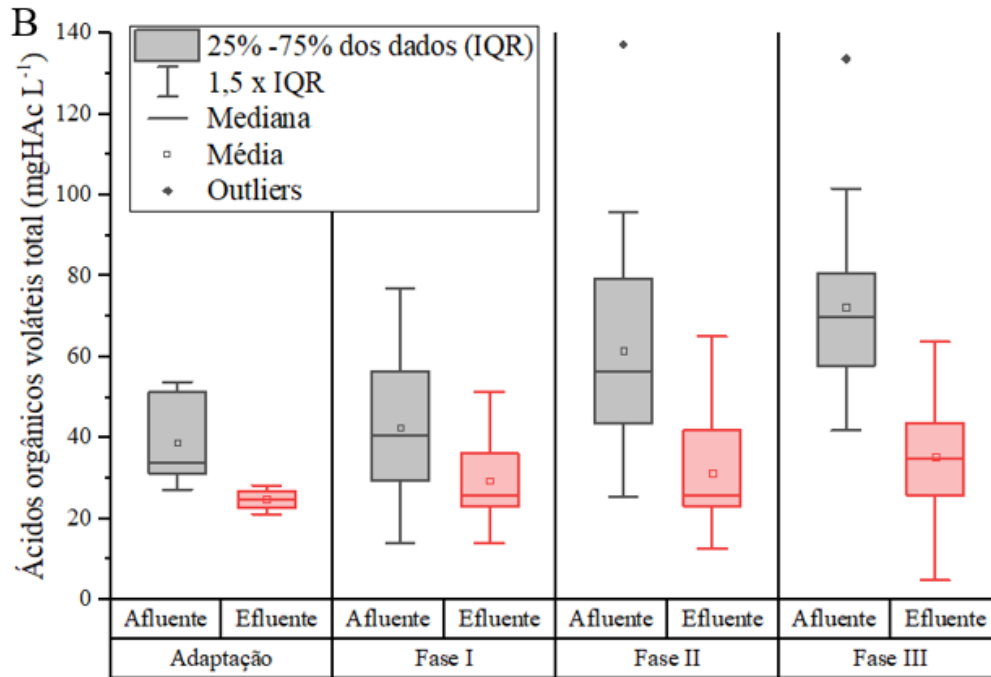


Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio. **B:** As caixas de Box Plot possuem linhas inferiores de quartil (25%), linhas do meio de valores médios (50%) e linhas superiores de quartil (75%). As linhas retas (-) que se estendem de cada extremidade da caixa são para mostrar a extensão dos dados em até 1,5 vezes a faixa interquartil (IQR).

Figura 5.20 – A: Variação temporal dos ácidos orgânicos voláteis total (AOV) efluente e afluente ao reator EGSB. B: Box Plot dos ácidos orgânicos voláteis totais efluente e afluente ao reator EGSB.





Fonte: Autora.

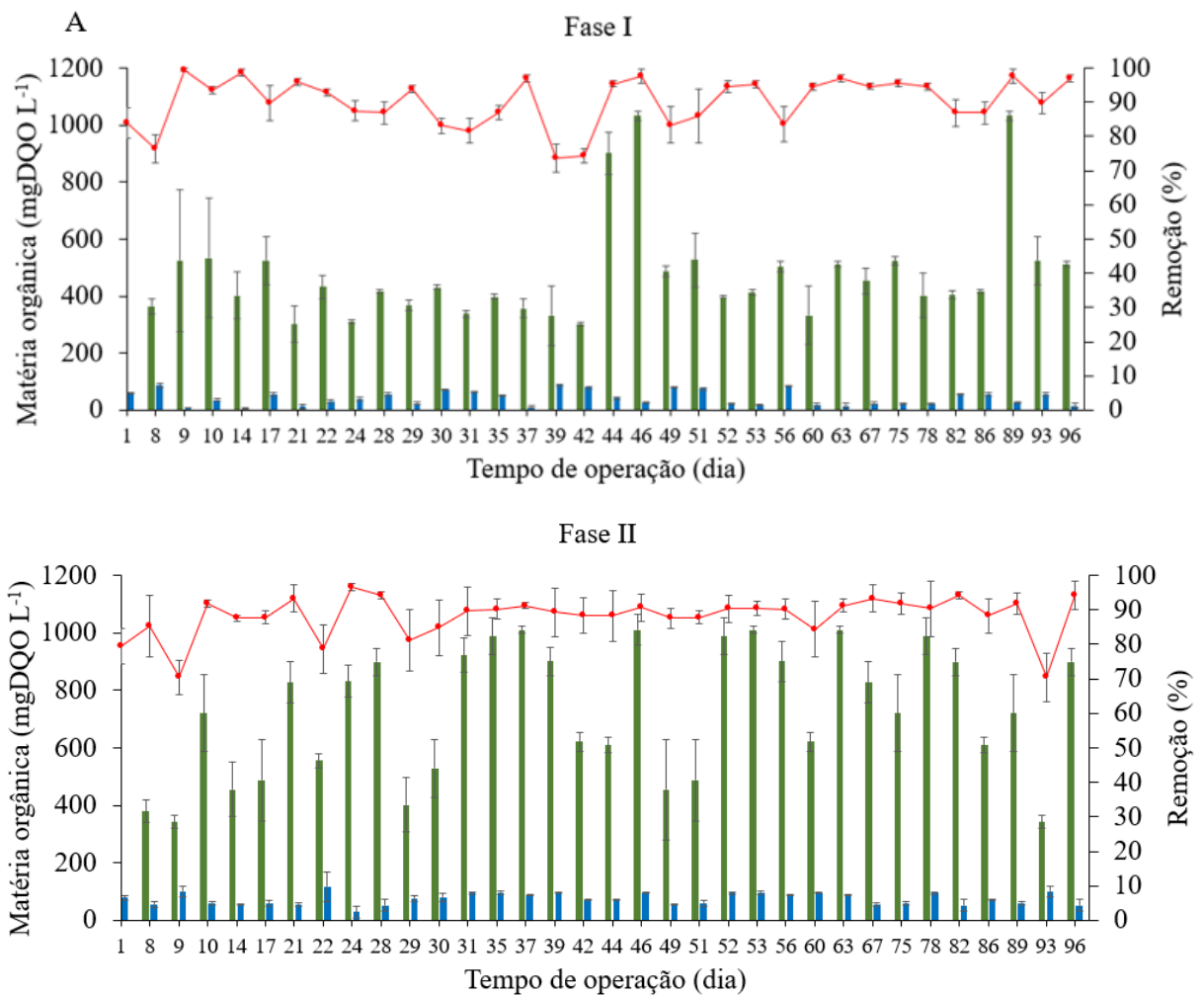
TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio. **B:** As caixas de Box Plot possuem linhas inferiores de quartil (25%), linhas do meio de valores médios (50%) e linhas superiores de quartil (75%). As linhas retas (-) que se estendem de cada extremidade da caixa são para mostrar a extensão dos dados em até 1,5 vezes a faixa interquartil (IQR).

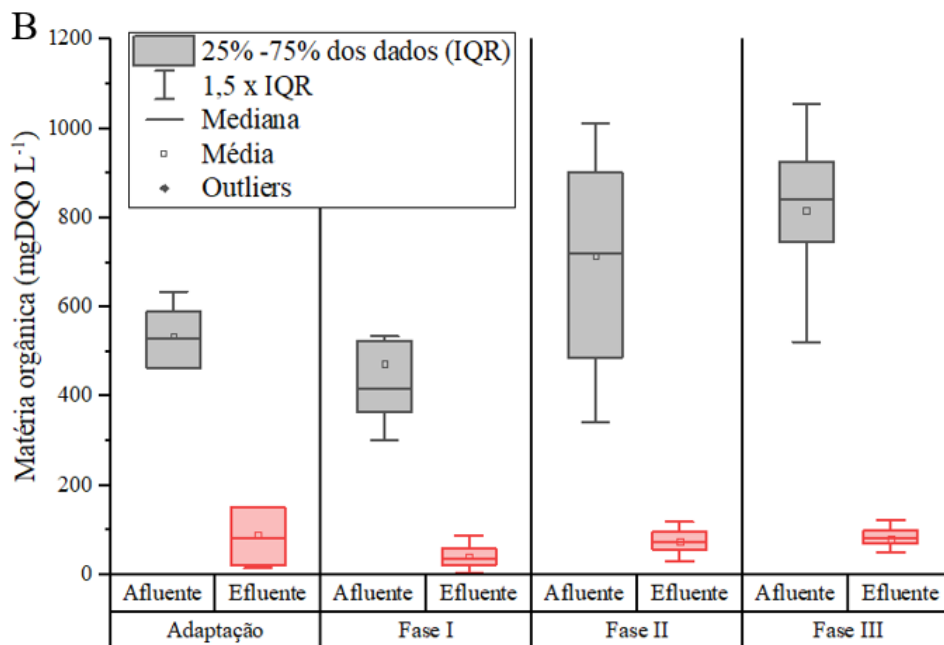
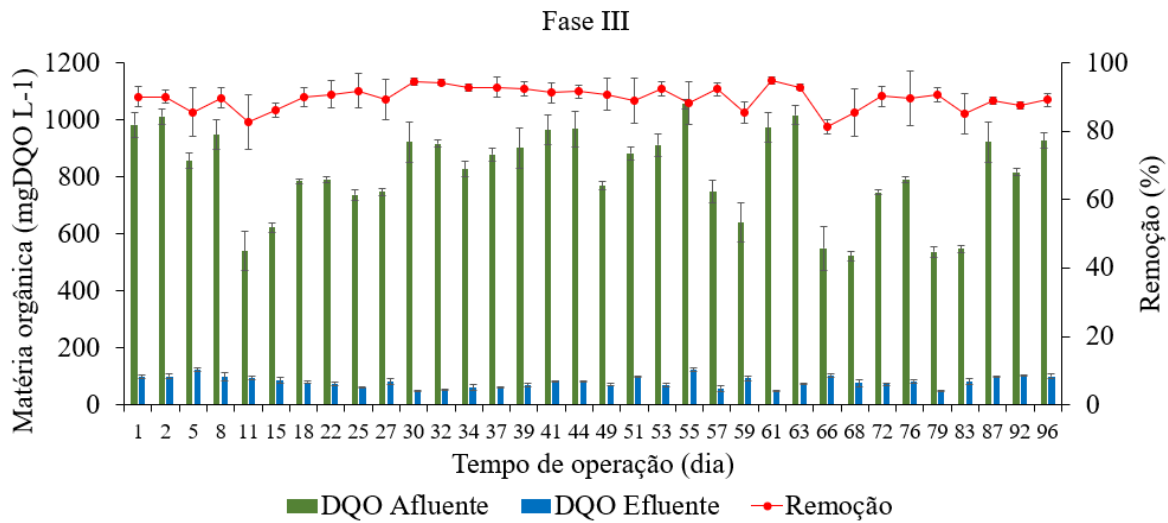
A matéria orgânica afluyente durante fase III (815±155 mg L⁻¹) foi significativamente maior (teste de Kruskal-Wallis; $p \leq 0,05$) que as fases I (473±179 mg L⁻¹) e II (716±231 mg L⁻¹). Além disso, foi observado aumento da carga orgânica específica (COE) de 79±30 mgDQO gSTV d⁻¹ (fase I) para 198±68 mgDQO gSTV d⁻¹ (fase II) e 251±48 mgDQO gSTV d⁻¹ (fase III). Isto é resultado do menor TDH empregado nas fases II e III e diminuição da quantidade de STV no lodo, os quais refletiram em menor diâmetro dos grânulos. A adição de 200 mgDQO L⁻¹ de etanol na fase III também contribuiu para o aumento de matéria orgânica afluyente e COE.

Metcalf & Eddy, (2013) recomendam COE entre 10 e 50 mgDQO gSTV⁻¹ d⁻¹ para reatores anaeróbios empregados na remoção de matéria orgânica de esgoto sanitário. Tais valores são menores que os observados neste estudo. Entretanto, via teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$), não observou-se diferença significativa entre a remoção de matéria orgânica nas fases I (90±7%), II (88±6%) e III (90±3%), indicando que a maior COE não afetou a eficiência do EGSB (Figura 5.21). Em estudos anteriores com EGSB, também foi reportado que a redução de STV no lodo (de 7,7 para 4,3 gSTV L⁻¹) e aumento de COE (de 71 para 108 mgDQO gSTV

d^{-1}) não comprometeu a remoção de matéria orgânica (>80%) e de LAS (>60%) (DELFORNO et al., 2012; OKADA et al., 2013). Isso porque, em reator EGSB, a recirculação do efluente e expansão do leito permitem distribuição uniforme do afluente, diluição de compostos tóxicos e aplicação de altas cargas orgânicas (NÚÑEZ e MARTÍNEZ, 1999; OKADA et al., 2013).

Figura 5.21 - A: Variação temporal da matéria orgânica afluente, efluente e remoção ao longo da operação do reator EGSB. B: Box Plot da matéria orgânica afluente e efluente ao longo da operação do reator EGSB.





Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio. **B:** As caixas de Box Plot possuem linhas inferiores de quartil (25%), linhas do meio de valores médios (50%) e linhas superiores de quartil (75%). As linhas retas (-) que se estendem de cada extremidade da caixa são para mostrar a extensão dos dados em até 1,5 vezes a faixa interquartil (IQR).

A concentração de ácido acético efluente do EGSB foi maior no período de adaptação (máximo de 74 mg L⁻¹). Para as fases I, II e III, a concentração máxima de tal ácido diminuiu para 24 mg L⁻¹, 5,5 mg L⁻¹ e 53 mg L⁻¹, respectivamente. Notou-se também aumento da diversidade de AOV efluente ao longo da operação do EGSB (Tabela 5.15). Durante a adaptação, foram identificados apenas os ácidos acético e propiônico no efluente, enquanto para

as fases I, II e III, além de tais ácidos, foram identificados os ácidos butírico, isovalérico e valérico e os álcoois etanol e n-butanol (Tabela 5.15). Em função da diminuição da concentração de ácido acético pode-se inferir sobre seu uso por algumas populações microbianas, enquanto a diversidade de ácidos orgânicos é resultado da maior atividade microbiana em função da maior COE aplicada (OKADA et al., 2013; MOTTERAN et al., 2020).

Na análise comparativa das duas últimas fases de operação do EGSB (II e III), de TDH semelhantes (~20h), notou-se maior concentração de ácido acético efluente durante a fase III (11,3-53 mg L⁻¹) em relação a II (2,3-5,5 mg L⁻¹). Este fato pode ser atribuído ao emprego de etanol na fase III, que é convertido diretamente em ácido acético e hidrogênio em condições anaeróbias (etanol + H₂O → acetato + H⁺ + 2 H₂). Apesar disso, a concentração de AOV no efluente da fase III foi inferior aquelas relacionadas a condições de inibição de processo anaeróbio, que são de 153-206 mg L⁻¹, 62-60 mg L⁻¹ e 93-110 mg L⁻¹ para os ácidos acético, butírico e propiônico, respectivamente (REYES-CONTRERAS, LEIVA, e VIDAL, 2019). Neste estudo, ao longo de toda operação do EGSB, as concentrações máximas de tais ácidos no efluente do reator foram de 74 mg L⁻¹ (adaptação), 2,3mg L⁻¹ (fase III) e 9,5 mg L⁻¹ (fase II), respectivamente.

Tabela 5.15 - Ácidos orgânicos voláteis e álcoois no esgoto sanitário afluente e efluente ao reator EGSB.

| | Concentração (mg L ⁻¹) | Adaptação | | Fase I | | Fase II | | Fase III | |
|-------------------|---------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | Afluente | Efluente | Afluente | Efluente | Afluente | Efluente | Afluente | Efluente |
| Ácido acético | mínimo | 8,1 | 31,1 | 1,1 | 8,2 | 19,8 | 2,3 | 20,21 | 11,3 |
| | máximo | 20,4 | 74,0 | 35,6 | 24,0 | 38,2 | 5,5 | 37,2 | 53,0 |
| Ácido propiônico | mínimo | - | 1,8 | - | 3,9 | - | - | 5,9 | 2,8 |
| | máximo | - | 4,9 | - | 9,5 | - | - | 10,9 | 7,2 |
| Ácido butírico | mínimo | - | - | - | - | - | 0,2 | 0,9 | 0,1 |
| | máximo | - | - | - | - | - | 1,0 | 1,9 | 2,3 |
| Ácido isovalérico | mínimo | - | - | - | - | 3,9 | - | - | - |
| | máximo | - | - | - | - | 13,5 | - | - | - |
| Ácido valérico | mínimo | - | - | - | - | 4,1 | 4,1 | - | - |
| | máximo | - | - | - | - | 10,0 | 10,1 | - | - |
| Etanol | mínimo | - | - | 0,5 | 0,1 | - | - | 1,5 | - |
| | máximo | - | - | 3,0 | 1,3 | - | - | 3,5 | - |
| n-butanol | mínimo | - | - | 0,9 | 0,7 | 4,1 | 1,1 | - | - |
| | máximo | - | - | 5,6 | 6,1 | 5,3 | 3,6 | - | - |

- não detectado; **TDH**: tempo de detenção hidráulico; **fases I**: TDH de 36h; **fase II**: TDH de 20h; **fase III**: TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO**: demanda química de oxigênio.

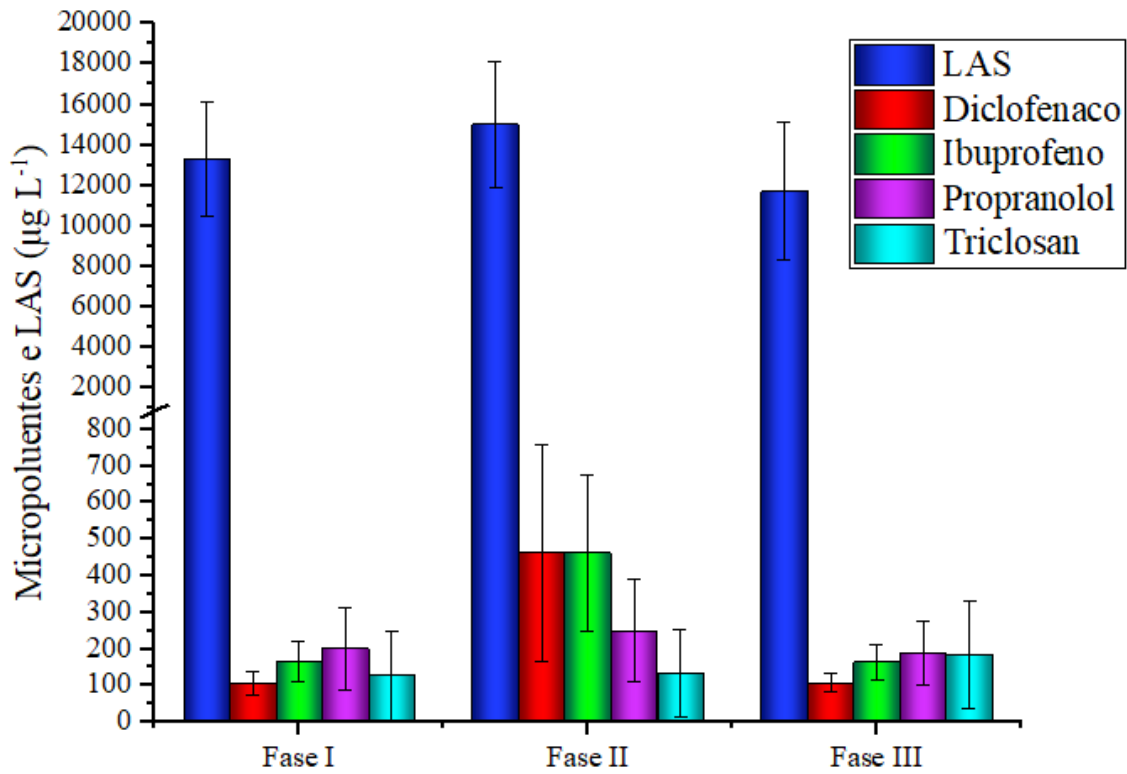
5.2.3. Remoção de diclofenaco, ibuprofeno, propranolol, triclosan e LAS em reator EGSB

Durante as fases I e III, as concentrações de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS no esgoto sanitário afluente ao EGSB foram semelhantes (teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$) (Figura 5.22).

Todavia, durante a fase II, notou-se concentração significativamente maior de DCF e IBU afluente ao EGSB em relação as demais fases (Teste de Kruskal-Wallis; $p \leq 0,05$) (Figura 5.22). Além disso, maior concentração de DCF e IBU ($300-1000 \mu\text{g L}^{-1}$) foi observada em 35% das amostras afluentes ao EGSB na fase II. Para as fases I e III, as maiores concentrações afluentes de tais anti-inflamatórios, observadas em 45% das amostras, foram a metade; ou seja, de 150 a $260 \mu\text{g L}^{-1}$.

O provável motivo para essa diferença, foi devido a maior parte da fase II de operação do EGSB ter ocorrido no período de inverno do Brasil (Figura 5.23). Nesta estação do ano é comum o aumento de consumo de fármacos, como analgésicos e anti-inflamatórios, devido a maior ocorrência de doenças associadas a este período sazonal, que é caracterizado pela baixa umidade e diminuição de temperatura. Dessa forma, no inverno há maior disseminação de vírus e bactérias e, por conseguinte, proliferação de doenças, tais como resfriado e gripe (FARES, 2013; GÓES et al., 2019; GUNDRY, 2019). A variação sazonal de outros fármacos, como antibióticos, também é comum em esgoto nesta estação do ano (COUTU et al., 2013; GALLARDO-ALTAMIRANO et al., 2019).

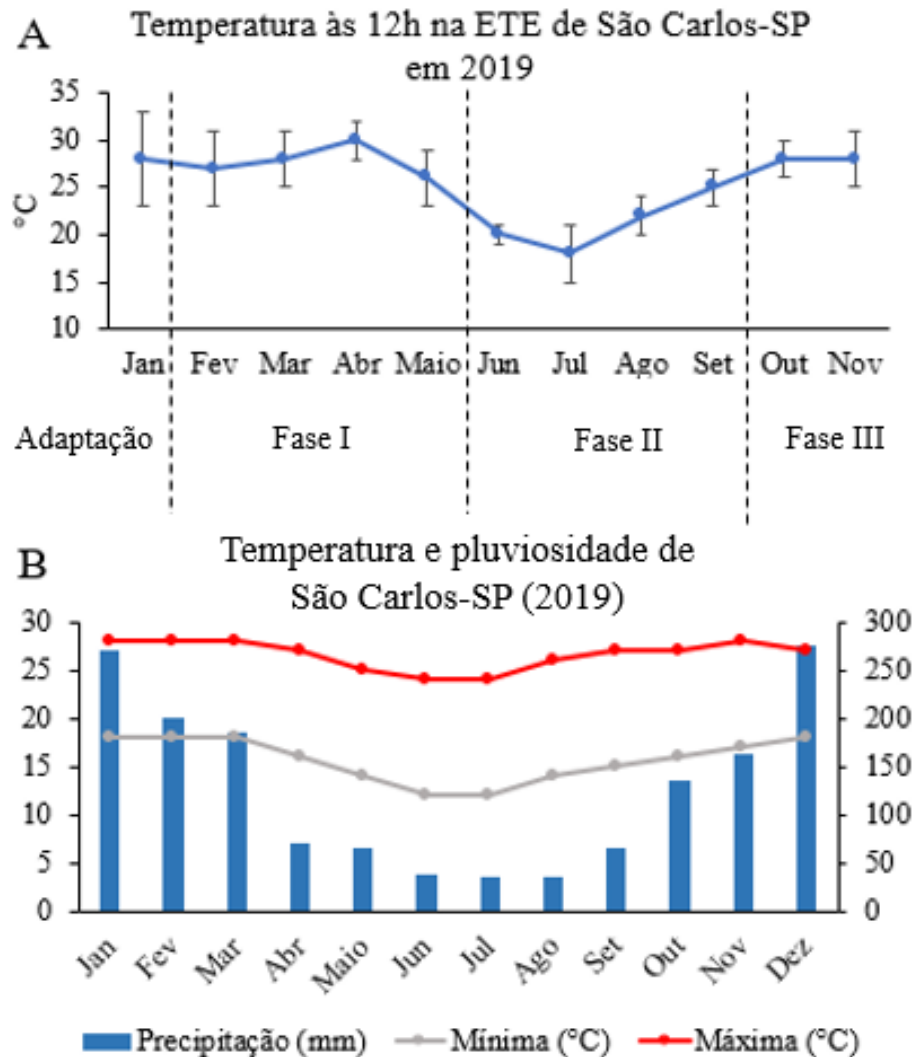
Figura 5.22 - Média das concentrações de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS no esgoto sanitário afluente ao reator EGSB.



Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Figura 5.23 - Comparação da temperatura ambiente do local onde o reator EGSB foi operado (ETE de São Carlos-SP) (A) com a do município de São Carlos-SP (B).



A: Fonte: Autora.

B: Fonte: INMET - Instituto Nacional de Meteorologia (2019) e Climatologia - São Carlos - SP (2019).

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Não se observou diferença significativa (teste de Mann-Whitney; $p \leq 0,05$) na remoção de DCF, IBU, PRO e LAS para as fases I (36±4h) e II (20±2h) (Tabela 5.16 e Figura 5.24). Portanto, pode-se inferir que menor valor de TDH não comprometeu significativamente a remoção desses compostos. Nas fases I (TDH 36±4h) e II (TDH 20±2h) a remoção de DCF, IBU, PRO e LAS foi de 37±18-35±11%, 43±18-44±16%, 46±25-51±23% e 63±11-65±12% para concentrações afluentes de 106±32-462±294 µg L⁻¹, 166±55-462±213 µg L⁻¹, 201±113-

250±141 µg L⁻¹ e 13±2-15±2 mg L⁻¹, respectivamente. Para TCS, por outro lado, notou-se maior remoção na fase I (72±17% para 127±120 µg L⁻¹ afluente) em comparação a fase II (51±13% para 135±119 µg L⁻¹ afluente).

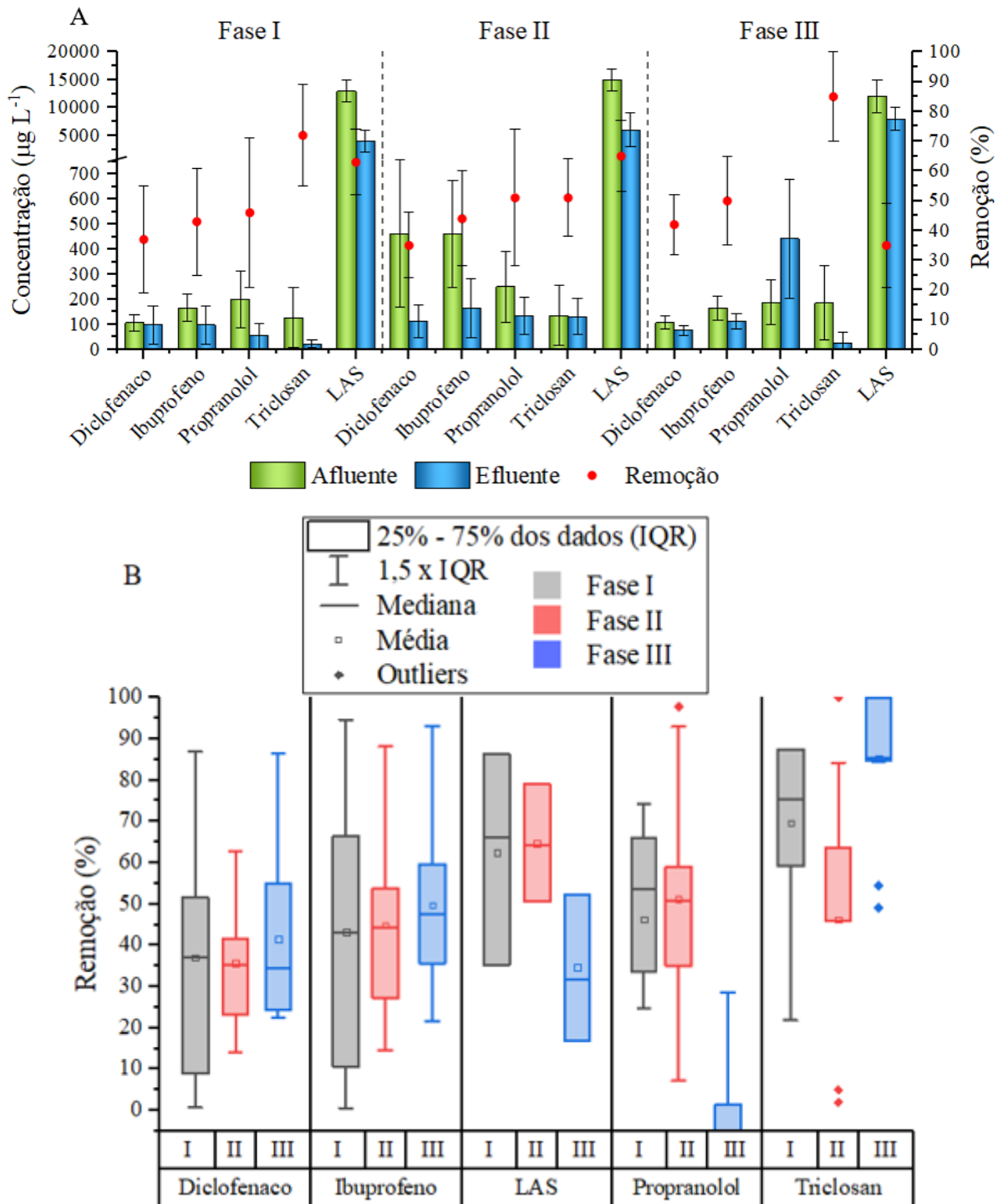
Tabela 5.16: Remoção dos micropoluentes emergentes e LAS em EGSB.

| | Fase I | Fase II | Fase III |
|---------------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| LAS | | | |
| Afluente (mg L ⁻¹) | 13±2 | 15±2 | 12±3 |
| Efluente (mg L ⁻¹) | 4±2 | 6±3 | 8±2 |
| Remoção (%) | 63±11 | 65±12 | 35±14 |
| Diclofenaco | | | |
| Afluente (µg L ⁻¹) | 106±32 | 462±294 | 107±26 |
| Efluente (µg L ⁻¹) | 98±76 | 112±67 | 76±20 |
| Remoção (%) | 37±18 | 35±11 | 42±10 |
| Ibuprofeno | | | |
| Afluente (µg L ⁻¹) | 166±55 | 462±213 | 164±47 |
| Efluente (µg L ⁻¹) | 98±76 | 164±117 | 113±31 |
| Remoção (%) | 43±18 | 44±16 | 50±15 |
| Propranolol | | | |
| Afluente (µg L ⁻¹) | 201±113 | 250±141 | 188±88 |
| Efluente (µg L ⁻¹) | 55±50 | 134±73 | 442±239 |
| Remoção (%) | 46±25 | 51±23 | -142±177 |
| Triclosan | | | |
| Afluente (µg L ⁻¹) | 127±120 | 135±119 | 185±148 |
| Efluente (µg L ⁻¹) | 22±16 | 131±72 | 27±41 |
| Remoção (%) | 72±17 | 51±13 | 85±15 |
| Duração (dias) | 96 | 96 | 96 |
| TDH (horas) | 36±4 | 20±2 | 20±3 |
| Vazão (L h⁻¹) | 1,92±0,17 | 3,45±0,28 | 3,45±0,43 |

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fase III:** etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio;

LAS: linear alquilbenzeno sulfonado; **Remoção:** degradação + adsorção.

Figura 5.24 – A: Remoção média dos micropoluentes e LAS em EGSB. B: Box Plot da remoção dos micropoluentes e LAS em EGSB.



Fonte: Autora.

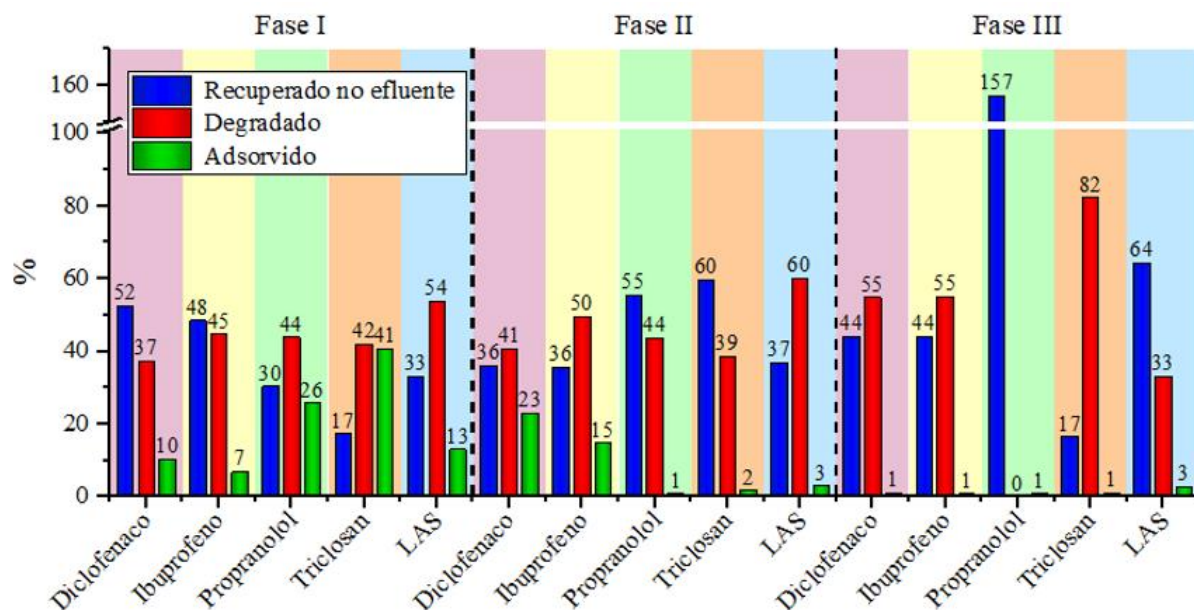
TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio; **Remoção:** degradação + adsorção. **B:** As caixas de Box Plot possuem linhas inferiores de quartil (25%), linhas do meio de valores médios (50%) e linhas superiores de quartil (75%). As linhas retas (-) que se estendem de cada extremidade da caixa são para mostrar a extensão dos dados em até 1,5 vezes a faixa interquartil (IQR).

Em geral, maior TDH favorece a remoção de compostos que ficam preferencialmente na fase líquida (hidrofílicos), pois fornece tempo suficiente para que os microrganismos os utilizem como substrato (GROS et al., 2010). Entretanto, a lipofilicidade de resíduos farmacêuticos, por exemplo, foi relacionada a persistência desses compostos durante a digestão anaeróbia (MALMBORG e MAGNÉR, 2015). Dessa forma, há compostos de baixa degradabilidade os quais a remoção não é influenciada pelo TDH de reator biológico com pH próximo a neutralidade (GROS et al., 2010; YANG et al., 2016), como o EGSB deste estudo. Isso porque, moléculas de hidrofobicidade moderada (como DCF, IBU, PRO e LAS), são ionizáveis em pH~7, o que facilita a transferência desses compostos entre a fase aquosa e sólida pois, a forma ionizada dos compostos é mais hidrofílica. Como resultado, estes compostos ficam em equilíbrio dinâmico entre o meio líquido e sólido. Dessa forma, a degradação daqueles que não são utilizados como principal substrato pelos microrganismos pode não ser influenciada pelo TDH (GROS et al., 2010; YANG et al., 2016), o que pode estar relacionado ao fato de não ter sido observado diferença significativa ($p \geq 0,05$) para a remoção de DCF, IBU, PRO e LAS entre as fases I e II do EGSB.

A molécula de TCS, por outro lado, é mais hidrofóbica que as de DCF, IBU, PRO e LAS, o que a torna mais propensa a particionar em lodo (TOHIDI e CAI, 2017). Dessa forma, para o TCS, a maior remoção na fase I, em comparação a II, está relacionada a sua maior adsorção nesta fase de operação do EGSB (Figura 5.25). Dentre todos os compostos, no lodo da fase I, observou-se maior adsorção de TCS (40%), seguido de PRO (25%) e LAS (13%). A maior adsorção desses compostos na fase I do EGSB, em comparação as demais, é resultado do preenchimento dos sítios ativos do lodo anaeróbio no estágio inicial de operação do reator (GARCÍA et al., 2002; OKADA et al., 2009; DELFORNO et al., 2012).

Para DCF e IBU, por outro lado, observou-se maior adsorção no lodo da fase II (Figura 5.25), sendo de 23% e 15%, respectivamente. Isso ocorreu, provavelmente, devido a maior disponibilidade de moléculas dos fármacos nesta fase operacional, uma vez que durante a fase II foi observado maior concentração de DCF e IBU afluente ao EGSB (Figura 5.22).

Figura 5.25 - Balanço de massa de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em EGSB.



Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Para as fases do EGSB com TDH semelhantes (~20h), observou-se remoção significativamente maior de DCF, IBU e TCS (teste de Mann-Whitney; $p \leq 0,05$) na presença de etanol (fase III) em comparação a ausência de cossubstrato (fase II). Na fase III, a remoção foi de $42 \pm 10\%$, $50 \pm 15\%$ e $85 \pm 15\%$ para DCF ($107 \pm 26 \mu\text{g L}^{-1}$ afluente), IBU ($164 \pm 47 \mu\text{g L}^{-1}$ afluente) e TCS ($185 \pm 148 \mu\text{g L}^{-1}$ afluente), respectivamente. Além disso, a degradação desses compostos também foi maior na presença de etanol (Figura 5.25).

Em contraste, para LAS e PRO, menor remoção (Figura 5.24) e degradação (Figura 5.25) foram observadas com emprego de etanol (fase III). A remoção de LAS diminuiu de $65 \pm 12\%$ na fase II ($15 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ afluente) para $35 \pm 14\%$ na fase III ($12 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ afluente). Para PRO a remoção diminuiu de $51 \pm 23\%$ na fase II ($250 \pm 141 \mu\text{g L}^{-1}$ afluente) para $-142 \pm 177\%$ na fase III ($188 \pm 88 \mu\text{g L}^{-1}$ afluente).

A presença/ausência de grupos funcionais nas estruturas moleculares, que doam/recebem elétrons, pode influenciar a remoção de poluentes recalcitrantes (YANG et al., 2016). Compostos com fortes grupos funcionais doadores de elétrons podem ser mais facilmente utilizados como substrato, em comparação àqueles que têm fortes grupos funcionais receptores de elétrons (YANG et al., 2016). LAS e PRO são constituídos de grupos funcionais doadores de elétrons (Figura 5.26), enquanto DCF, IBU e TCS possuem grupos funcionais

receptores de elétrons (Figura 5.26). Dessa forma, LAS e PRO podem ser mais facilmente degradados em comparação a DCF, IBU e TCS. Tais diferenças nas estruturas moleculares dos compostos podem justificar as diferentes remoções observadas na ausência (fase II) e presença do cossustrato etanol (fase III) para TDH semelhantes (~20h). Por exemplo, a suplementação de metanol resultou em competição por substrato e diminuição de 15% da eficiência de remoção de LAS padrão (12-28 mg L⁻¹) em reatores anaeróbios (OKADA et al., 2013; DELFORNO et al. 2015). Dinâmica semelhante pode ter ocorrido neste estudo devido ao emprego do substrato de fácil assimilação etanol e, conseqüentemente, resultado em menor eficiência de remoção de LAS e PRO durante a fase III de operação do EGSB (Tabela 5.16 e Figuras 5.24 e 5.25).

Em contraste ao presente estudo, Motteran et al., (2018) observaram maior remoção de LAS empregando etanol em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com água residuária de lavanderia comercial (ARLC). Todavia, a concentração de LAS utilizada (43 mg L⁻¹) por tais autores promoveu efeito tóxico a microbiota e, para este caso, o emprego do cossustrato metabólico etanol, reduziu a toxicidade do LAS e aumentou a eficiência de remoção do surfactante (24-56%) (MOTTERAN et al., 2018). Neste estudo, a concentração de LAS afluyente ao EGSB durante as fases I, II e III foram de 13±2 mg L⁻¹, 15±2 mg L⁻¹ e 12±3 mg L⁻¹, respectivamente. Tais valores foram abaixo daqueles que exercem efeito tóxico a comunidade microbiana anaeróbia (43 mg L⁻¹) conforme relatado por Motteran et al., (2018).

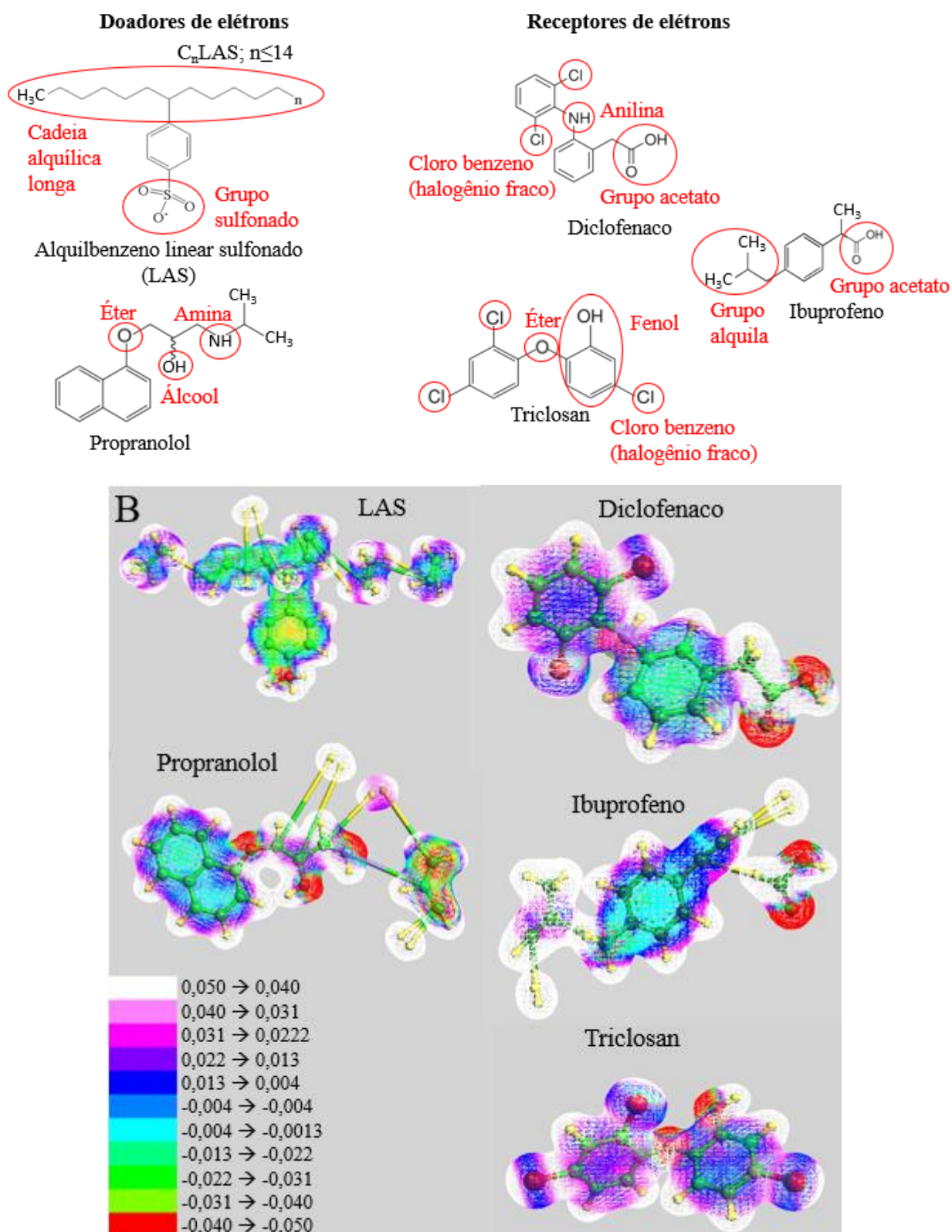
Esta mesma observação referente ao surfactante LAS pode ser relacionada ao fármaco PRO. A ação tóxica do PRO em bactérias anaeróbias é semelhante ao efeito de surfactantes. Trata-se de um composto anfifílico que atua nas membranas celulares e causa alterações na organização das bicamadas lipídicas, resultando em rupturas da membrana celular para concentração acima de 30 mg L⁻¹ (FOUNTOULAKIS et al., 2004; 2008). A concentração de PRO afluyente ao EGSB durante as fases I, II e III foi consideravelmente abaixo de tal valor, sendo de 201±113 µg L⁻¹, 250±141 µg L⁻¹ e 188±88 µg L⁻¹, respectivamente.

Todavia, é importante ressaltar que a concentração média de PRO efluente durante a fase III (442±239 µg L⁻¹) foi maior que a afluyente (188±88 µg L⁻¹). Villar-Navarro et al., (2018), ao avaliarem a eficiência de remoção de 81 micropoluentes em ETE, observaram a presença de alguns fármacos (dentre eles o PRO) apenas no efluente. Isso foi atribuído à liberação de fármacos parentais metabólicos (por exemplo, conjugados) durante o tratamento de esgoto e também à dessorção das moléculas do lodo (STASINAKIS, 2012; MCCURRY et al., 2014; SUN et al., 2014). Comportamento análogo foi relatado para edulcorantes, como a sucralose

(BRORSTRÖM-LUNDÉN et al., 2008; LI et al., 2018). Brorström-lundén et al. (2008) sugeriram que a remoção inadequada da sucralose é devido a uma fração de carga recebida que pode conjugar ou complexar os subprodutos de sua degradação. Assim, os conjugados (ou complexos) são transformados novamente no composto original, resultando em remoção negativa de sucralose em ETE (BRORSTRÖM-LUNDÉN et al., 2008). Neste estudo, o etanol na fase III pode ter servido como doador de elétrons as moléculas de PRO e favorecido a liberação de conjugados do fármaco. Consequentemente, isso pode ter resultado na dessorção de PRO do lodo do EGSB e formação do composto original. De fato, PRO não foi detectado no lodo da fase III do EGSB (Figura 5.25) e observou-se maior porcentagem de recuperação da massa do fármaco no efluente do reator durante esta fase operacional (Figura 5.25).

Diferente de LAS e PRO, os fármacos DCF e IBU e o bactericida TCS, pertencem ao grupo de estruturas moleculares compostas por fortes receptores de elétrons (Figura 5.26). Moléculas com fortes receptores de elétrons são mais difíceis de serem utilizadas como substrato de crescimento e são removidas, principalmente, por cometabolismo (VEETIL et al., 2012; STASINAKIS et al., 2012; FISCHER e MAJEWSKY, 2014; GONZALEZ-GIL et al., 2018). A presença de compostos facilmente degradáveis, como álcoois de cadeia curta (etanol), pode induzir o metabolismo microbiano (SIMON e KRONECK, 2013). Isso foi evidenciado neste estudo pelo aumento de COE, promovido pela adição de etanol na fase III, e ausência de diferença estatística entre os valores de remoção de matéria orgânica nas fases I, II e III. Este fato pode ter contribuído para maior remoção via cometabolismo de DCF, IBU e TCS na fase III (Figura 5.25). Além disso, Veetil et al., (2012) relataram maior degradação (87%) de TCS (10 mg L⁻¹) em sistema metanogênico alimentado com acetato como cossustrato, quando comparado a condição desnitrificante (~80%) e redutora de sulfato (~70%). Neste estudo, além do uso do etanol, foi observado maior concentração de ácido acético afluente e efluente durante a fase III em comparação as demais fases (Tabela 5.15), o que também pode ter favorecido maior remoção de DCF, IBU e TCS nesta fase em relação as demais (Figura 5.25).

Figura 5.26 - A: Estrutura molecular de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS. B: Mapa de superfície do potencial eletrostático.



Fonte: Autora.

B: Dados gerados pelo software ArgusLab®. Quanto menor a faixa de valores, mais eletronegativa é a região.

5.2.4. Caracterização microbiana do reator EGSB

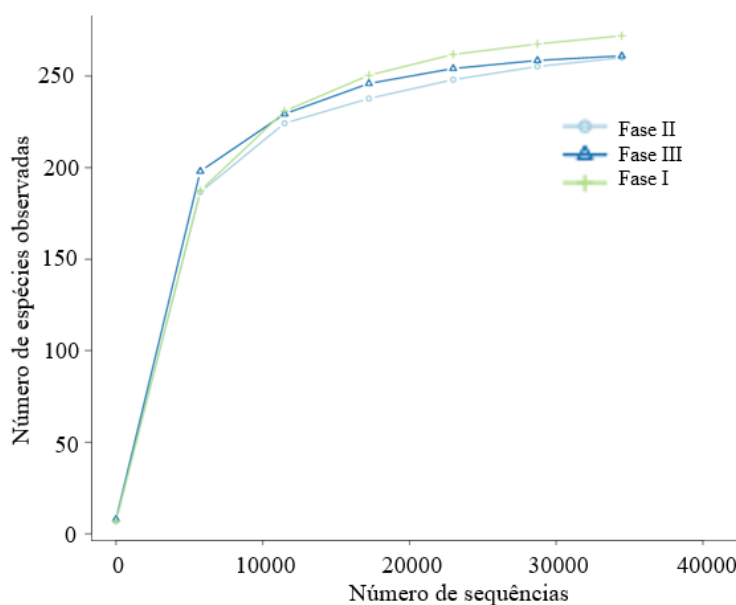
A cobertura de Good (Tabela 5.17) para os Domínios Bacteria e Archaea foi superior a 99% para o lodo das fases I, II e III do EGSB, indicando alta cobertura das amostras. Além disso, por meio das curvas de rarefação (Figura 5.27) foi observado platô, com representação satisfatória das populações microbianas. Nos lodos das fases I, II e III, foram identificados 133 e 11 gêneros para os Domínio Bacteria e Archaea, respectivamente

Tabela 5.17 - Índices ecológicos dos Domínios Bacteria e Archaea dos lodos de todas as fases de operação do reator EGSB.

| Índices ecológicos | Domínio Bacteria | | | Domínio Archaea | | |
|--------------------|------------------|---------|----------|-----------------|---------|----------|
| | Fase I | Fase II | Fase III | Fase I | Fase II | Fase III |
| Good coverage | 1,00 | 0,99 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Shannon H | 2,52 | 2,51 | 2,86 | 0,94 | 1,11 | 0,69 |
| Chao-1 | 120,10 | 115,80 | 126,90 | 11,00 | 11,00 | 11,00 |

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Figura 5.27 - Curva de rarefação nos lodos de todas das fases de operação do reator EGSB.

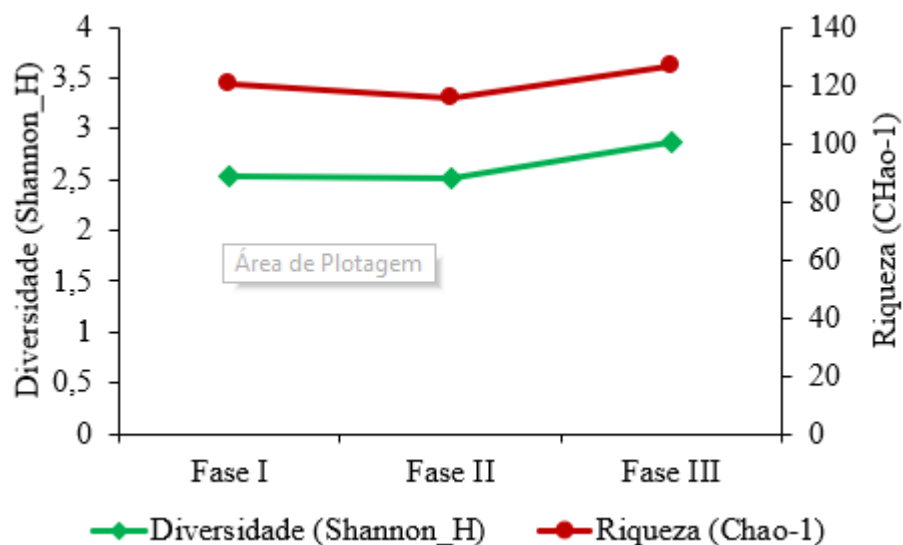


Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Foi observada pequena diferença nos valores dos índices de Shannon H e Chao-1 para os lodos das fases I e II (Tabela 55.17; Figura 5.28). Isso porque, apesar do esgoto sanitário ser constituído de compostos tóxicos e recalcitrantes, sua composição complexa não afeta negativamente a diversidade e riqueza microbiana e é suficiente para manter a atividade dos microrganismos (GRANATTO et al., 2019). No lodo da fase III, por outro lado, notou-se maiores valores dos índices ecológicos (Tabela 5.17; Figura 5.28). Tal fato pode estar relacionado a adição de etanol na alimentação do EGSB, que é fonte de carbono e energia para os microrganismos, e pode aumentar a diversidade microbiana (MOTTERAN et al., 2018).

Figura 5.28 - Variação dos índices de diversidade e riqueza bacteriana nos lodos de todas as fases de operação do reator EGSB.

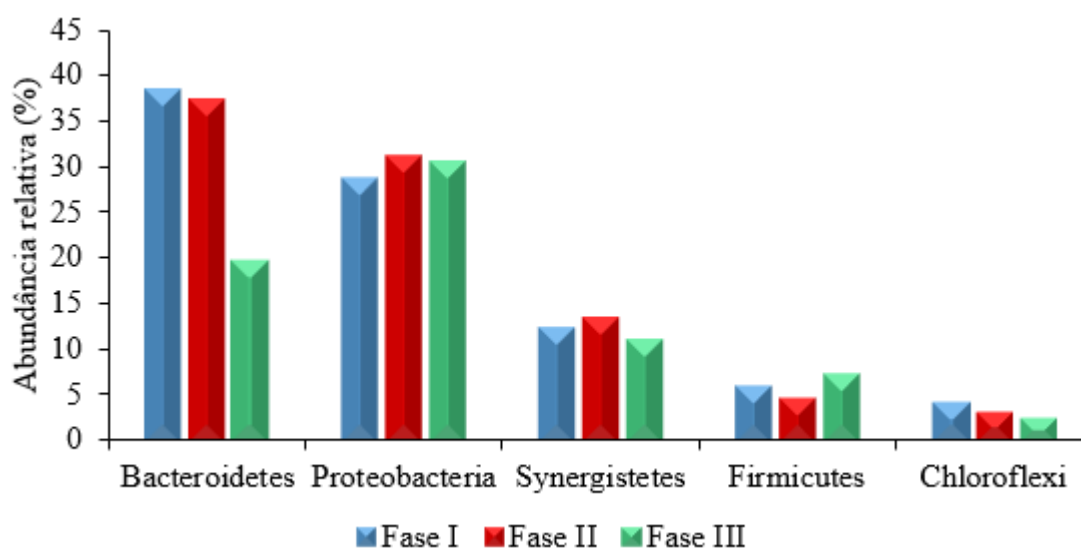


Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Em relação a classificação taxonômica, para o Domínio Bacteria, observou-se representantes dos Filos Bacteroidetes, Proteobacteria, Synergistetes, Firmicutes e Chloroflexi com abundância relativa acima de 2,5% nos lodos de todas as fases operacionais do EGSB (Figura 5.29). Tratam-se de bactérias comumente identificadas em reatores anaeróbios, cujos membros são de ampla capacidade metabólica (CYDZIK-KWIATKOWSKA e ZIELIŃSKA, 2016; GRANATTO et al., 2019).

Figura 5.29 - Abundância relativa (>2,5%) dos principais Filos bacterianos identificados no lodo de todas as fases de operação do reator EGSB.



Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

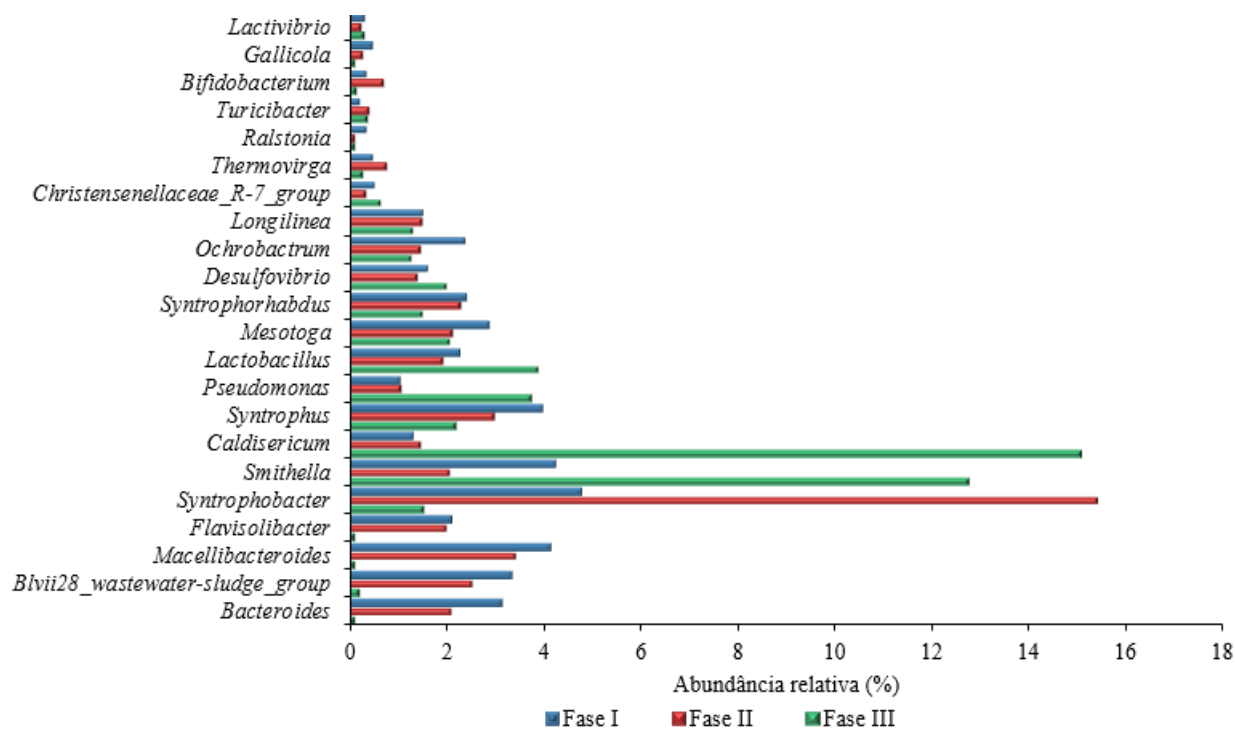
Dentre tais Filos, notou-se maior variação da abundância relativa para Bacteroidetes, com diminuição de 38% (fase I) e 37% (fase II) para 20% (fase III). Em relação aos gêneros de Bacteroidetes, foi observado maior abundância relativa (>2%) para *Bacteroides*, *Blvii28_wastewater-sludge_group*, *Macellibacteroides* e *Flavisolibacter* nos lodos fases I e II. Em contraste, no lodo da fase III, tais gêneros foram identificados com abundância relativa abaixo de 0,2%. Semelhante ao presente estudo, Dai et al., (2018) reportaram diminuição de bactérias do Filo Bacteroidetes de 40% para 10% após a suplementação de mediadores redox artificiais para acelerar a redução de corante azo e recuperar a metanogênese. Tais autores atribuíram este fato, principalmente ao quase desaparecimento de *Bacteroides* e *Blvii28_wastewater-sludge_group*.

Neste estudo, a menor abundância relativa de Bacteroidetes na fase III, pode estar relacionado a diversos fatores. Por exemplo, membros deste Filo podem ser bactérias hidrolíticas e fermentativas que utilizam, principalmente, proteínas e carboidratos como substratos (NISHIYAMA et al., 2009; THOMAS et al., 2011). Em estudos anteriores com reatores anaeróbios foi reportada a diminuição da abundância relativa de Bacteroidetes após o aumento da concentração substratos de fácil assimilação, como etanol, ácidos butírico, propiônico e acético (KAMPMANN et al., 2012; JIN et al., 2019; HE et al., 2020). Os gêneros

de Bacteroidetes identificados neste estudo foram *Bacteroides* e *Blvii28_wastewater-sludge_group* que são fermentadoras de carboidratos, mas não utilizam AOV e álcoois para crescimento (SU et al., 2014). *Macellibacteroides* são anaeróbias estritas, utilizam glicose, sacarose e peptona como doadores de elétrons, mas não acetato, lactato e piruvato (JABARI et al., 2012). *Flavisolibacter* são anaeróbias facultativas, utilizam proteínas como substrato, mas não AOV e álcoois. Além disso, o ácido propiônico pode inibir seu crescimento (KÄMPFER; LODDERS; FALSEN, 2011; ANARTHANAN et al., 2016). Na fase III de operação do EGSB, além do uso de etanol na alimentação do reator, foi observada maior concentração afluenta dos ácidos acético (53 mg L^{-1}) e propiônico ($10,9 \text{ mg L}^{-1}$). Tais compostos podem ter favorecido outras populações microbianas em detrimento daquelas pertencentes ao Filo Bacteroidetes identificadas nesta pesquisa.

Em relação aos gêneros pertencentes aos outros Filos do Domínio Bacteria identificados neste estudo, observou-se *Syntrophobacter*, *Smithella*, e *Caldisericum* com abundância relativa entre 1,3% e 4,7% no lodo da fase I (Figura 6). Por outro lado, na fase II, *Syntrophobacter* foi mais abundante (15,4%), enquanto na fase III, foram *Smithella* (12,7%) e *Caldisericum* (15,1%).

Figura 5.30 - Gêneros do Domínio Bacteria identificados com abundância relativa acima de 0,1% nos lodos de todas as fases de operação do reator EGSB.



Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Syntrophobacter são anaeróbios sintróficos, capazes de oxidar a matéria orgânica e convertê-la em lactato e propionato por meio da utilização de sulfato e fumarato como receptores de elétrons. No final do processo, há liberação de produtos que servem como substratos para outros microrganismos, como acetato, succinato, formiato, dióxido de carbono e hidrogênio (PLUGGE et al., 2012; DELFORNO et al., 2019). Devido à presença de genes da fumarato redutase no genoma de *Syntrophobacter*, tais microrganismos participam dos estágios iniciais da degradação de LAS (DELFORNO et al., 2019). *Syntrophobacter* também podem degradar compostos aromáticos sob condições anaeróbias estritas (BRENNER 2005). Inclusive, microrganismos semelhantes a tal gênero foram identificados nos lodos dos reatores em bateladas deste estudo de maior concentração e remoção de DCF e IBU (Figura 5.7). Na fase II foi observada maior concentração afluente de DCF e IBU em comparação as demais fases do EGSB (Tabela 5.16 e Figura 5.22), o que pode estar relacionado a maior abundância relativa de *Syntrophobacter* nesta fase operacional.

Smithella são capazes de realizar β -oxidação e oxidar propionato, crotonato, butirato, malato e fumarato em acetato (DE BOK et al., 2001; SOBIERAJ e BOONE, 2015; DELFORNO et al., 2019). Portanto, podem utilizar diversos compostos presentes no esgoto sanitário (GRANATTO et al., 2019). No entanto, foi relatado que alguns representantes do gênero *Smithella* crescem mais rapidamente na presença de propionato em comparação a outros substratos, como crotonato e butirato (LIU et al., 1999). Neste estudo, foi observado maior concentração de ácido propiônico no afluente (5,9-10,9 mg L⁻¹) do EGSB durante a fase III, o que pode estar relacionado a maior abundância relativa de *Smithella* nesta fase operacional.

Para *Caldisericum*, outros fatores podem estar relacionados a sua maior abundância relativa no lodo da fase III (Figura 5.30). Por exemplo, em digestores anaeróbios de tratamento de águas residuárias com carga orgânica elevada (11 kgDQO m³ d⁻¹) foi relatado o enriquecimento de microrganismos pertencentes a tal gênero (CHEN et al., 2017). Neste estudo, maior COE foi aplicada durante a fase III (251±48 mgDQO gSTV d⁻¹), devido a adição de etanol na alimentação do EGSB, o que pode ter contribuído para enriquecimento de *Caldisericum*. Representantes de tal gênero são anaeróbios estritos, metabolizam carboidratos por meio da respiração de enxofre e produzem ácidos graxos de cadeia curta, participando assim da redução de compostos sulfonados (MORI et al., 2009; SHIVAJI et al., 2011; KIM e LEE, 2016). Além disso, *Caldisericum* também pode degradar compostos fenólicos (CHENG et al., 2014; SHI et al., 2019).

Em relação aos demais gêneros identificados com abundância relativa acima de 1%, em todas as fases operacionais do EGSB, têm-se *Syntrophus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Mesotoga*, *Syntrophorhabdus*, *Desulfovibrio*, *Longilinea* e *Ochrobactrum* (Figura 5.30).

Microrganismos pertencentes ao gênero *Syntrophus*, são capazes de realizar β -oxidação, degradar cadeias de ácidos graxos e realizar clivagem de anéis aromáticos sob condições anaeróbias (BRENNER et al., 2005; CENTURION et al., 2018; DELFORNO et al., 2019). *Pseudomonas* são anaeróbios facultativos e, com base em estudos de metatranscriptômica para determinação de genes e taxonomias associadas a degradação anaeróbia do LAS, tal gênero foi o único previsto estar envolvido em todas as etapas desta degradação, uma vez que realizam ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e clivagem de anéis aromáticos (CENTURION et al., 2018; DELFORNO et al., 2019). Além disso, *Pseudomonas* são capazes de expressar enzimas álcool desidrogenase, tais como a álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) que tem especificidade

para etanol (SCHOMBURG et al., 2017), o que pode estar relacionado a sua maior abundância relativa na fase III (Figura 5.30).

Lactobacillus e *Desulfovibrio* podem expressar enzimas álcool desidrogenase, como a EC 1.1.1.2 (SCHOMBURG et al., 2017), o que também pode estar relacionado a maior abundância relativa de tais gêneros na fase III em comparação as demais fases do EGSB (Figura 6). Além de álcool, *Lactobacillus* também metabolizam carboidratos, aminoácidos, ésteres de ácidos graxos, malato, nitrato e nitrito (HAMMES e VOGEL, 1995). Adicionalmente, sintetizam os ácidos lático e acético e dióxido de carbono (HAMMES e VOGEL, 1995). *Desulfovibrio*, por sua vez, são bactérias anaeróbias redutoras de sulfato capazes de degradar carboidratos, compostos aromáticos e de realizar dessulfonação (BRENNER et al., 2005; HEIDELBERG et al., 2004).

Syntrophorhabdus, são anaeróbios estritos, realizam β -oxidação e expressam os genes *bamA* e *OCH CoA hydrolase putative*, que participam da degradação de anéis aromáticos em associação sintrófica com arqueias metanogênicas (QIU et al., 2008; KUEVER, 2014; CENTURION et al., 2018; DELFORNO et al., 2019). *Mesotoga* também são anaeróbios estritos e utilizam carboidratos, proteínas, compostos sulfonados e aromáticos clorados como substrato de crescimento (PULLIAM HOLOMAN, E 1998; NESBØ et al., 2012; ZHAXYBAYEVA et al., 2012). Além disso, possuem capacidade específica de transferência horizontal de genes redutores da dehalogenase, favorecendo o processo de desaloespiração em comunidades microbianas anaeróbias e, conseqüentemente, a degradação de contaminantes clorados (ZHAXYBAYEVA et al., 2012). *Ochrobactrum* também podem expressar enzimas importantes para degradação de compostos clorados, tais como clorato redutase e clorito dismutase (CHEN et al., 2019). Tais atividades enzimáticas são importantes para a degradação dos aromáticos clorados TCS e DCF. *Longilinea* também podem exercer papel importante na degradação desses compostos. Representantes de tal gênero foram isolados de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados (YAMADA et al., 2007; YAMADA e SEKIGUCHI, 2018). Nas fases I e II do EGSB, observou-se maior adsorção de TCS e DCF, respectivamente (Figura 3), o que pode estar relacionado a maior abundância relativa de *Mesotoga*, *Ochrobactrum* e *Longilinea* nos lodos dessas fases operacionais, em função da maior disponibilidade de moléculas de tais compostos aromáticos clorados (Figura 5.30).

Em relação aos outros gêneros do Domínio Bacteria, identificados com abundância relativa entre 0,6% e 0,1%, têm-se *Christensenellaceae_R-7_group*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Gallicola*, *Lactivibrio*, *Thermovirga* e *Ralstonia* (Figura 5.30).

Christensenellaceae_R-7_group são anaeróbios estritos, produzem ácido acético no final da fermentação e foram relacionados a utilização de sulfato e amônio e degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (MOROTOMI et al., 2012; OUYANG et al., 2019; TANG et al., 2019). Membros dos gêneros *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Gallicola* e *Lactivibrio*, também são anaeróbios estritos e produzem diversos AOV no final da fermentação, além de formiato e dióxido de carbono (EZAKI et al., 2001; BOSSHARD et al., 2002; BELENGUER et al., 2006; QIU et al., 2014). *Thermovirga*, por sua vez, utilizam AOV de cadeia longa e compostos sulfonados (DAHLE e BIRKELAND, 2006; GÖKER et al., 2012; DU et al., 2019; WANG et al., 2017). *Ralstonia* também podem utilizar AOV, como por exemplo para produção de polihidroxicanoatos. Entretanto, quando utilizam acetato e lactato, podem produzir butirato e propionato (BHATIA et al., 2019). Além disso, podem desenvolver-se em meios contendo compostos fenólicos e realizar a desnitrificação a partir do nitrato (GENIN e BOUCHER, 2004; GENIN e DENNY, 2012). Por fim, *Lactivibrio* também são anaeróbios estritos e utilizam lactato, álcool, carboidrato e aminoácidos. Os principais produtos finais de sua fermentação são acetato e hidrogênio (QIU et al., 2014).

Diante do exposto, observou-se que os gêneros mais abundantes (>0,1%) identificados no lodo anaeróbico do reator EGSB, ao longo de toda sua operação, são importantes para digestão anaeróbia de compostos recalcitrantes incluídos no esgoto sanitário, bem como realizam sintrofismo com outras bactérias e arqueias (Tabela 5.18). Além disso, são capazes de realizar diversas vias metabólicas para a degradação de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS, que incluem ω e β -oxidação de cadeias alquílicas, dessulfonação, descloração redutiva, clivagem de anel aromático, entre outras (Figura 5.31-A) (LARA-MARTÍN et al., 2010; VEETIL et al., 2012; GHATTAS et al., 2017; GARCÍA-ESPINOZA e MIJAYLOVA NACHEVA, 2019; GRANATTO et al., 2019).

Tabela 5.18 - Total das abundâncias relativas dos gêneros do Domínio Bacteria identificados no lodo de todas as fases de operação do reator EGSB relacionados ao metabolismo microbiano envolvido na degradação de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS e ao sintrofismo com arqueias.

| Filo | Família | Gêneros | Abundância relativa (%) | | |
|----------------------------------|----------------------|--|-------------------------|----------------|-----------------|
| | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| ω e β-oxidação | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| Bacteroidetes | Bacteroidaceae | <i>Bacteroides</i> | 3,1 | 2,1 | 0,1 |
| Bacteroidetes | Rikenellaceae | <i>Blvii28_wastewater-sludge_group</i> | 3,3 | 2,5 | 0,2 |
| Bacteroidetes | Tannerellaceae | <i>Macellibacteroides</i> | 4,1 | 3,4 | 0,1 |
| Proteobacteria | Syntrophaceae | <i>Smithella</i> | 4,2 | 2,0 | 12,7 |
| Proteobacteria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | 1,0 | 1,0 | 3,7 |
| Thermotogae | Kosmotogaceae | <i>Mesotoga</i> | 2,9 | 2,1 | 2,1 |
| Proteobacteria | Syntrophorhabdaceae | <i>Syntrophorhabdus</i> | 2,4 | 2,3 | 1,5 |
| Proteobacteria | Rhizobiaceae | <i>Ochrobactrum</i> | 2,4 | 1,4 | 1,3 |
| Caldiserica | Caldiseriaceae | <i>Caldisericum</i> | 1,3 | 1,5 | 15,1 |
| Firmicutes | Christensenellaceae | <i>Christensenellaceae_R-7_group</i> | 0,5 | 0,3 | 0,6 |
| Proteobacteria | Burkholderiaceae | <i>Ralstonia</i> | 0,3 | 0,1 | 0,1 |
| Actinobacteria | Bifidobacteriaceae | <i>Bifidobacterium</i> | 0,3 | 0,7 | 0,1 |
| Firmicutes | Erysipelotrichaceae | <i>Turicibacter</i> | 0,2 | 0,4 | 0,4 |
| Total | | | 26,0 | 19,9 | 38,0 |
| Dessulfonação | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| Proteobacteria | Syntrophobacteraceae | <i>Syntrophobacter</i> | 4,7 | 15,4 | 1,5 |
| Proteobacteria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | 1,0 | 1,0 | 3,7 |
| Thermotogae | Kosmotogaceae | <i>Mesotoga</i> | 2,9 | 2,1 | 2,1 |
| Proteobacteria | Desulfovibrionaceae | <i>Desulfovibrio</i> | 1,6 | 1,4 | 2,0 |
| Caldiserica | Caldiseriaceae | <i>Caldisericum</i> | 1,3 | 1,5 | 15,1 |
| Firmicutes | Christensenellaceae | <i>Christensenellaceae_R-7_group</i> | 0,5 | 0,3 | 0,6 |
| Synergistetes | Synergistaceae | <i>Thermovirga</i> | 0,5 | 0,8 | 0,3 |
| Total | | | 12,6 | 23,1 | 25,9 |
| Formação de H₂ | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| Bacteroidetes | Bacteroidaceae | <i>Bacteroides</i> | 3,1 | 2,1 | 0,1 |
| Bacteroidetes | Rikenellaceae | <i>Blvii28_wastewater-sludge_group</i> | 3,3 | 2,5 | 0,2 |
| Bacteroidetes | Tannerellaceae | <i>Macellibacteroides</i> | 4,1 | 3,4 | 0,1 |
| Bacteroidetes | Chitinophagaceae | <i>Flavisolibacter</i> | 2,1 | 2,0 | 0,1 |
| Proteobacteria | Syntrophobacteraceae | <i>Syntrophobacter</i> | 4,7 | 15,4 | 1,5 |
| Proteobacteria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | 1,0 | 1,0 | 3,7 |
| Firmicutes | Lactobacillaceae | <i>Lactobacillus</i> | 2,3 | 1,9 | 3,9 |
| Proteobacteria | Syntrophorhabdaceae | <i>Syntrophorhabdus</i> | 2,4 | 2,3 | 1,5 |
| Proteobacteria | Desulfovibrionaceae | <i>Desulfovibrio</i> | 1,6 | 1,4 | 2,0 |
| Caldiserica | Caldiseriaceae | <i>Caldisericum</i> | 1,3 | 1,5 | 15,1 |
| Synergistetes | Synergistaceae | <i>Thermovirga</i> | 0,5 | 0,8 | 0,3 |
| Chloroflexi | Anaerolineaceae | <i>Longilinea</i> | 1,5 | 1,5 | 1,3 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|--|---------------|----------------|-----------------|
| Synergistetes | Synergistaceae | <i>Lactivibrio</i> | 0,3 | 0,2 | 0,3 |
| Total | | | 28,1 | 35,9 | 30,0 |
| Formação de acetato | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| Bacteroidetes | Bacteroidaceae | <i>Bacteroides</i> | 3,1 | 2,1 | 0,1 |
| Bacteroidetes | Rikenellaceae | <i>Blvii28_wastewater-sludge_group</i> | 3,3 | 2,5 | 0,2 |
| Bacteroidetes | Tannerellaceae | <i>Macellibacteroides</i> | 4,1 | 3,4 | 0,1 |
| Proteobacteria | Syntrophaceae | <i>Smithella</i> | 4,2 | 2,0 | 12,7 |
| Proteobacteria | Syntrophaceae | <i>Syntrophus</i> | 3,9 | 3,0 | 2,2 |
| Proteobacteria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | 1,0 | 1,0 | 3,7 |
| Firmicutes | Lactobacillaceae | <i>Lactobacillus</i> | 2,3 | 1,9 | 3,9 |
| Proteobacteria | Syntrophorhabdaceae | <i>Syntrophorhabdus</i> | 2,4 | 2,3 | 1,5 |
| Proteobacteria | Desulfovibrionaceae | <i>Desulfovibrio</i> | 1,6 | 1,4 | 2,0 |
| Caldiserica | Caldiseriaceae | <i>Caldisericum</i> | 1,3 | 1,5 | 15,1 |
| Firmicutes | Christensenellaceae | <i>Christensenellaceae_R-7_group</i> | 0,5 | 0,3 | 0,6 |
| Synergistetes | Synergistaceae | <i>Thermovirga</i> | 0,5 | 0,8 | 0,3 |
| Firmicutes | Clostridiales | <i>Gallicola</i> | 0,5 | 0,3 | 0,1 |
| Actinobacteri | Bifidobacteriaceae | <i>Bifidobacterium</i> | 0,3 | 0,7 | 0,1 |
| Synergistetes | Synergistaceae | <i>Lactivibrio</i> | 0,3 | 0,2 | 0,3 |
| Firmicutes | Erysipelotrichaceae | <i>Turicibacter</i> | 0,2 | 0,4 | 0,4 |
| Total | | | 29,4 | 23,8 | 43,2 |
| Oxidação de alcoois | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| Proteobacteria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | 1,0 | 1,0 | 3,7 |
| Firmicutes | Lactobacillaceae | <i>Lactobacillus</i> | 2,3 | 1,9 | 3,9 |
| Proteobacteria | Desulfovibrionaceae | <i>Desulfovibrio</i> | 1,6 | 1,4 | 2,0 |
| Synergistetes | Synergistaceae | <i>Lactivibrio</i> | 0,3 | 0,2 | 0,3 |
| Total | | | 5,2 | 4,6 | 9,9 |
| Clivagem de anel aromático | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| Proteobacteria | Syntrophobacteraceae | <i>Syntrophobacter</i> | 4,7 | 15,4 | 1,5 |
| Proteobacteria | Syntrophaceae | <i>Syntrophus</i> | 3,9 | 3,0 | 2,2 |
| Proteobacteria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | 1,0 | 1,0 | 3,7 |
| Proteobacteria | Syntrophorhabdaceae | <i>Syntrophorhabdus</i> | 2,4 | 2,3 | 1,5 |
| Proteobacteria | Desulfovibrionaceae | <i>Desulfovibrio</i> | 1,6 | 1,4 | 2,0 |
| Caldiserica | Caldiseriaceae | <i>Caldisericum</i> | 1,3 | 1,5 | 15,1 |
| Firmicutes | Christensenellaceae | <i>Christensenellaceae_R-7_group</i> | 0,5 | 0,3 | 0,6 |
| Proteobacteria | Burkholderiaceae | <i>Ralstonia</i> | 0,3 | 0,1 | 0,1 |
| Total | | | 15,8 | 25,0 | 26,7 |
| Descloração redutiva | | | Fase I | Fase II | Fase III |
| Thermotogae | Kosmotogaceae | <i>Mesotoga</i> | 2,9 | 2,1 | 2,1 |
| Proteobacteria | Rhizobiaceae | <i>Ochrobactrum</i> | 2,4 | 1,4 | 1,3 |
| Chloroflexi | Anaerolineaceae | <i>Longilinea</i> | 1,5 | 1,5 | 1,3 |
| Total | | | 6,7 | 5,1 | 4,6 |

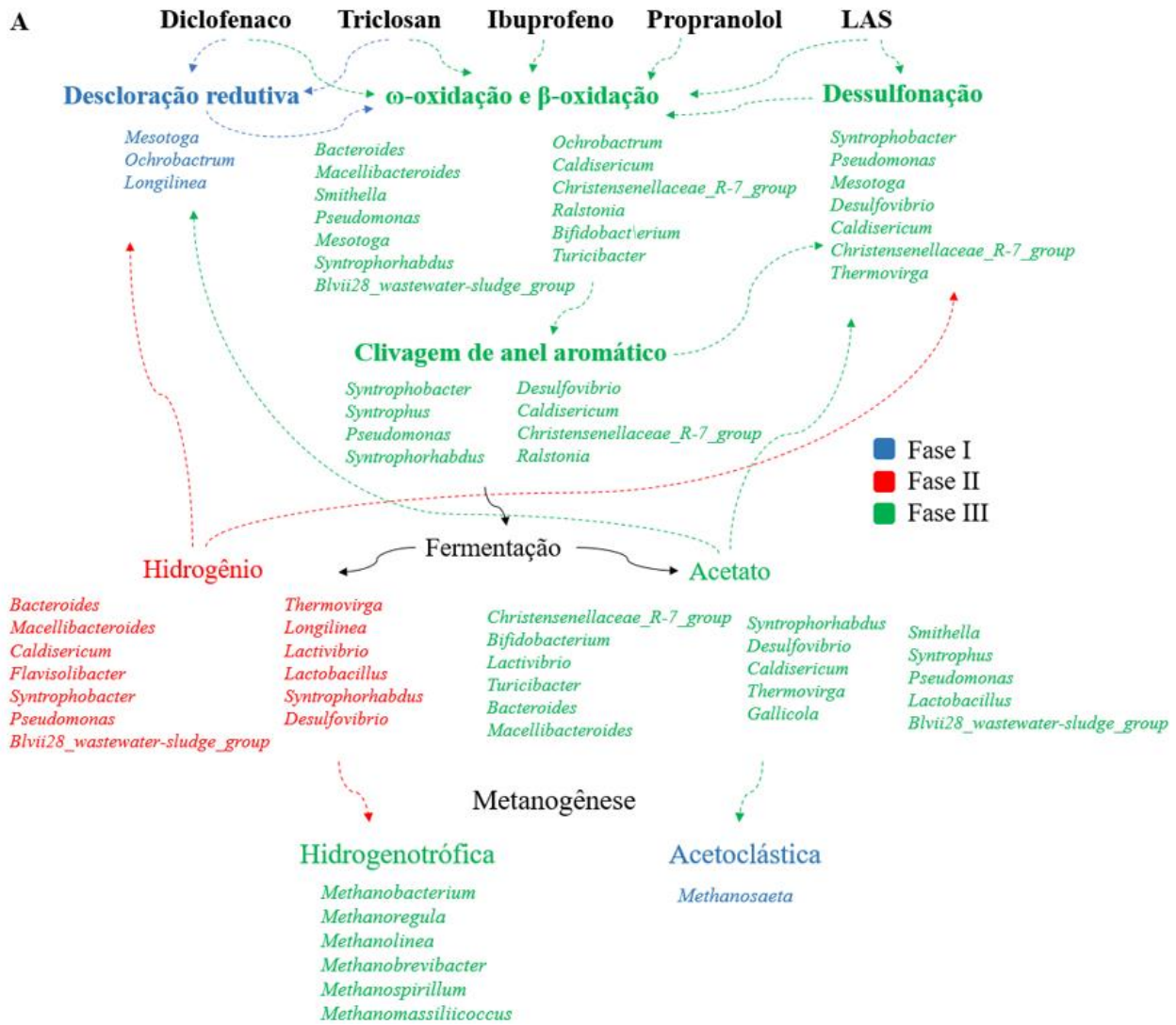
Escala de cor: sendo vermelho maior valor, amarelo valor intermediário e verde menor valor; **TDH:** tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

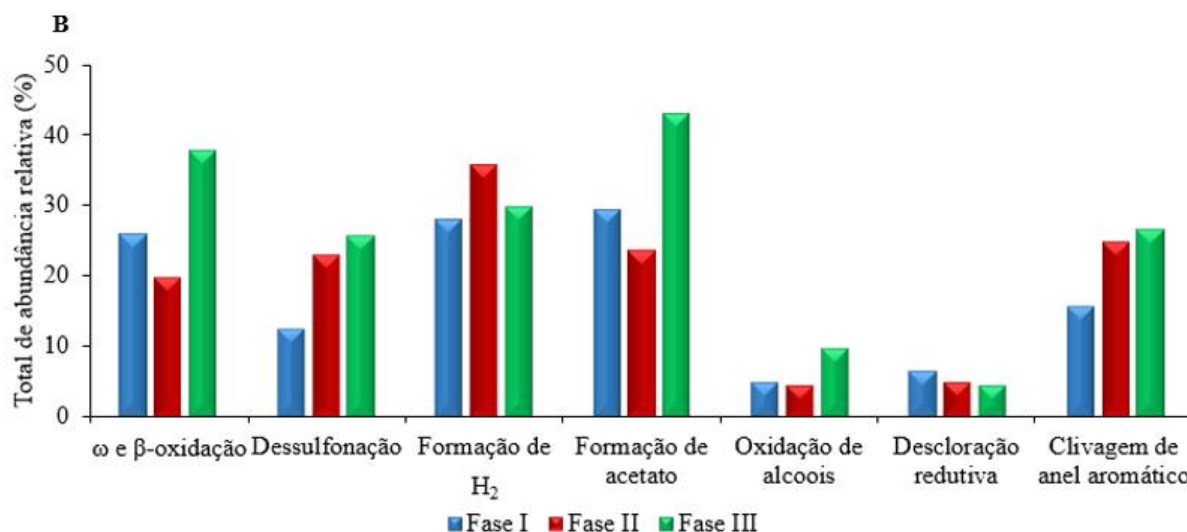
De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.18 e Figura 5.31-B, no lodo da fase I observou-se maior abundância relativa total de bactérias capazes de realizar descloração redutiva em comparação as demais fases. Isso pode estar relacionado a maior adsorção de TCS nesta fase inicial de operação do EGSB (Figura 5.25). Bactérias haloinspirantes (*e.g.*, *Mesotoga*, *Ochrobactrum* e *Longilinea*) realizam descloração redutiva por meio da utilização de organoclorados, como DCF e TCS, como receptores de elétrons (KRZMARZICK et al., 2012; MCNAMARA AND KRZMARZICK, 2013). Além disso, bactérias haloinspirantes podem ser enriquecidas em ambientes contendo TCS devido a tolerância desses microrganismos a poluentes clorados (KRZMARZICK et al., 2012; MCNAMARA AND KRZMARZICK, 2013). Ainda no lodo da fase I, observou-se abundância relativa total para gêneros bacterianos fermentativos (Figura 5.31-B e Tabela 5.18), que podem fornecer compostos que são utilizados como receptores de elétrons por bactérias haloinspirantes durante a descloração redutiva (Figura 31-A) (LUIJTEN et al., 2004; STAMS et al., 2006).

No lodo da fase II, por outro lado, observou-se maior abundância relativa total de gêneros bacterianos que formam hidrogênio no final da fermentação (Figura 5.31-A e Tabela 5.18). Além disso, em comparação a fase I, observou-se aumento da abundância relativa total de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Figura 5.31-B e Tabela 5.18). O esgoto sanitário é constituído de baixa concentração de sulfato (GRANATTO et al., 2019), todavia, as BRS podem realizar fermentação e respiração anaeróbia utilizando hidrogênio e acetato como receptores de elétrons (Figura 5.31-A), contribuindo de forma geral para a remoção de matéria orgânica (HARADA et al., 1994).

Em contraste às fases I e II, no lodo da fase III, em que foi adicionado o cossustrato metabólico etanol, notou-se predominância de metabolismo microbiano relacionado a degradação de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS, como ω e β -oxidação, dessulfonação e clivagem de anel aromático (Figura 5.31-A). Além disso, neste mesmo lodo, foi observado maior abundância relativa total de gêneros que oxidam etanol e formam substratos para arqueias metanogênicas, como o acetato (Figura 5.31-B).

Figura 5.31: A: Fluxograma de rotas metabólicas de tratamento de DCF, TCS, IBU, PRO e LAS e predominância do metabolismo microbiano envolvido em cada fase de operação EGSB. B: Total das abundâncias relativas dos gêneros do Domínio Bacteria identificados no lodo de todas as fases de operação do EGSB relacionados ao metabolismo microbiano envolvido na degradação de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS.





Fonte: Autora.

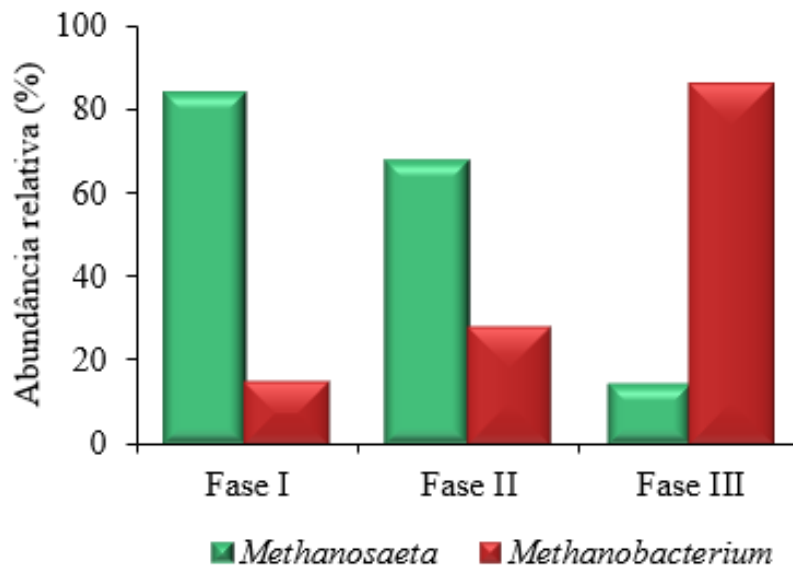
Rotas metabólicas baseadas em: Lara-Martín et al., (2010); Veetil et al., (2012); Ghattas et al., (2017); García-Espinoza and Mijaylova Nacheva, (2019). **TDH:** tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Em relação ao Domínio Archaea, observou-se abundância relativa de 75%, 91% e 83% do Filo Euryarchaeota nos lodos das fases I, II e III, respectivamente. Tal Filo inclui todas as arqueias metanogênicas (LI et al., 2013).

Os gêneros *Methanolinea*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanomethylovorans*, *Methanolobus* e *Methanoregula* foram identificados com abundância relativa abaixo de 4% em todos os lodos das fases de operação do EGSB. Tratam-se de arqueias hidrogenotróficas e metilotróficas e, geralmente, são observadas com menor abundância relativa em lodo de reatores anaeróbico de tratamento de esgoto sanitário (GUO et al., 2015; GRANATTO et al., 2019).

Os gêneros *Methanosaeta* e *Methanobacterium*, por outro lado, foram identificados com maior abundância relativa em todos os lodos do EGSB (Figura 5.32). No lodo das fases I e II, a abundância relativa de *Methanosaeta* foi de 84% e 67%, respectivamente. Para a fase III, notou-se maior abundância relativa de *Methanobacterium* (86%).

Figura 5.32 - Gêneros do Domínio Archaea identificados no lodo de todas as fases de operação do reator EGSB.



Fonte: Autora.

TDH: tempo de detenção hidráulico; **fases I:** TDH de 36h; **fase II:** TDH de 20h; **fase III:** TDH 20h + etanol (200 mgDQO L⁻¹); **DQO:** demanda química de oxigênio.

Methanosaeta são metanogênicas acetoclásticas estritas (GUO et al., 2015), enquanto *Methanobacterium* são hidrogenotróficas (MAUS et al., 2014). Dessa forma, a diminuição da abundância relativa de *Methanosaeta* e aumento de *Methanobacterium*, da fase I para a II, pode estar relacionado a maior abundância relativa total de bactérias fermentativas na fase II (Figura 5.31-B e Tabela 5.18).

Na fase III, a menor abundância relativa de *Methanosaeta* pode estar relacionado a maior de BRS nesta fase operacional do EGSB (Tabela 5.18). As BRS competem com as metanogênicas por hidrogênio e acetato, e se sobressaem em relação as arqueias, devido ao seu menor valor de KS (*half saturation coefficient*) para tais receptores de elétrons (HARADA et al., 1994). Além disso, arqueias acetoclásticas são suscetíveis a surfactantes, como LAS e álcool etoxilado (GAVALA AND AHRING, 2002; MÖSCHE e MEYER, 2002). Moura et al., (2019) reportaram diminuição da abundância relativa de *Methanosaeta* de 30% para 5% ao final da operação EGSB (420 dias) alimentado com ARLC contendo de 5 a 36 mg L⁻¹ de LAS. Neste estudo, o LAS esteve presente no esgoto sanitário afluente ao EGSB durante toda sua operação (12±3 a 15±2 mg L⁻¹). Inclusive, outros compostos tóxicos e recalcitrantes, como fenol, indolizina e limoneno, fazem parte da composição do esgoto sanitário afluente a ETE de São

Carlos-SP (Brasil) (GRANATTO et al., 2019). Tais fatores também podem ter contribuído para a diminuição de *Methanosaeta* durante a operação do EGSB (Figura 5.32), pois o lodo esteve exposto ao LAS e demais compostos do esgoto sanitário por longo período, sendo de 308 dias, 212 dias e 116 dias para as fases III, II e I, respectivamente.

Methanobacterium, por outro lado, tem metabolismo versátil e podem utilizar outros substratos além de hidrogênio e acetato, como monóxido e dióxido de carbono, álcool isopropílico e formiato (DAI et al., 1998; MAUS et al., 2014; PARSHINA e STAMS, 2015). Dessa forma podem realizar sintrofismo com diversos gêneros do Domínio Bacteria identificados neste estudo, como *Syntrophobacter*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Turcibacter*, *Bifidobacterium*, *Gallicola* e *Lactivibrio*, devido ao fornecimento de formiato e dióxido de carbono, por exemplo, proveniente do metabolismo dessas bactérias (PLUGGE et al., 2012; QIU et al., 2014). Além disso, *Methanobacterium* são resistentes a estresses abióticos, pois codificam vários genes que estão relacionados a adaptação, tais como di-mio-inositol-1,1-fosfato e n-glicerol-1-fosfato (MÜLLER et al., 2005; MAUS et al., 2014). Este fato também pode estar relacionado a manutenção e/ou favorecimento de *Methanobacterium* em detrimento das demais arqueias expostas ao esgoto sanitário ao longo da operação do EGSB (Figura 5.32).

6. Considerações Finais

Potencial metanogênico e remoção de diclofenaco e ibuprofeno

O aumento da concentração de DCF e IBU favoreceu maior remoção e degradação desses fármacos. Entretanto, foram mais recalcitrantes na ausência de cossustratos ou presença de fumarato. Além disso, sob tais condições obteve-se menor produção de metano em comparação ao uso de etanol e metanol:etanol. Dentre os cossustratos utilizados, etanol foi mais propício a fornecer substratos prontamente disponíveis para arqueias metanogênicas acetoclásticas, resultando em maior rendimento de metano e maior degradação de DCF ($27,15 \pm 0,30\%$) e IBU ($18,52 \pm 0,23\%$).

Em função da estrutura química dos fármacos, foi observada menor produção de metano e menor remoção de IBU em relação ao DCF. O DCF é composto por um grupo fenilacético que propiciou maior liberação de acetato para o uso bacteriano e metanogênico. Além disso, DCF resultou em maior diversidade e menor dominância de populações bacterianas. Portanto, é necessário consórcio microbiano diverso para remoção de substratos complexos, como os fármacos. Os átomos de cloro da estrutura molecular de DCF também favoreceu o Filo Chloroflexi e gênero *Acidovorax* que participam da degradação de compostos halogenados.

Gêneros do Domínio Bacteria capazes de realizar clivagem de anel aromático, descloração redutiva, β -oxidação e metabolizar ácidos graxos, tais como *Smithella*, *Sulfuricurvum*, *Syntrophus*, *Arcobacter*, *Pseudomonas*, *Syntrophorhabdus*, *Zooglea* e *Sulfurospirillum*, foram identificados na condição DCF ($43,20 \pm 0,01$ mg L⁻¹) e IBU ($43,42 \pm 0,03$ mg L⁻¹) com o cossustrato etanol (200 mgDQO L⁻¹). Tratam-se de bactérias que podem ter sido enriquecidas na presença de etanol. O sintrofismo dessas bactérias com arqueias metanogênicas devido a produção de metabólitos fermentativos, assim como o fornecimento de acetato oriundo do etanol, contribuiu para a maior abundância relativa do gênero *Methanosaeta* do Domínio Archaea. Além de tais arqueias, gêneros de bactérias capazes de expressar a enzima acetato quinase, como *Clostridium* e *Desulfovibrio*, foram identificados.

Potencial metanogênico e remoção de triclosan e propranolol

A degradação de PRO em até $28,5 \pm 0,5$ mg L⁻¹ ocorreu na ausência de cossustratos devido a maior biodisponibilidade e favorecimento do cometabolismo a partir de compostos

degradáveis do esgoto sanitário. Por outro lado, $55,0 \pm 1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de PRO não favoreceu a produção de metano e sua degradação. Para o TCS, esse limiar de concentração ($5,0 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) foi menor devido a sua maior adsorção na biomassa e, conseqüentemente, maior toxicidade a comunidade microbiana anaeróbia.

A utilização dos cossustratos metabólicos etanol, metanol:etanol e fumarato foi estratégia bem-sucedida e favoreceu maior produção de metano. Para condição etanol, substratos prontamente disponíveis para as arqueias metanogênicas resultaram em maior produção de metano, maior remoção de matéria orgânica e maior degradação dos micropoluentes emergentes.

Bactérias relacionadas as vias metabólicas de organoclorados, tais como o filo Chloroflexi e os gêneros *Longilinea*, *Arcobacter*, *Mesotoga* e *Sulfuricurvum*, exercem papel importante na degradação de TCS, uma vez que foram mais abundantes na biomassa exposta a tal bactericida. Para o PRO, o gênero *VadinBC27* parece desempenhar papel importante na degradação do fármaco. Os demais gêneros bacterianos identificados nas biomassas expostas a TCS ou a PRO, como *Christensenellaceae_R-7_group*, *Smithella* e *Pseudomonas*, possuem capacidade metabólica de adaptação a compostos tóxicos. Além disso, possuem mecanismos metabólicos envolvidos em etapas importantes para a degradação de TCS e PRO, tais como clivagem de anel aromático, descloração redutiva, ω e β -oxidação e formação de H_2 e acetato.

O uso de etanol em codigestão com TCS contribuiu para maior abundância relativa de *Methanosaeta*, devido ao fornecimento de acetato oriundo da degradação deste álcool. Para biomassa exposta a PRO (sem cossustrato), *Methanobacterium* foi mais abundante devido a sua capacidade de adaptação aos estresses abióticos, bem como sua versatilidade em utilizar diferentes substratos. O segundo gênero mais abundante nesta biomassa foi *Methanosaeta*, devido ao fornecimento de acetato proveniente do metabolismo de bactérias, tais como *VadinBC27*, *Christensenellaceae_R-7_group*, *Smithella*, *Pseudomonas*, *Syntrophus*, *Arcobacter*, *Petrimonas* e *Syntrophorhabdus*.

A principal via de produção de metano no reator de maior degradação do bactericida TCS em codigestão com etanol foi a acetoclástica, enquanto no reator de maior degradação do fármaco PRO (sem cossustrato), a produção de metano ocorreu, tanto pela via acetoclástica, como pela via hidrogenotrófica.

Reator EGSB em escala aumentada

A remoção de LAS, DCF, IBU, PRO e TCS foi governada por suas estruturas moleculares. A diminuição do TDH de 36 ± 4 h (fase I) para 20 ± 2 h (fase II) não influenciou na remoção desses compostos devido as suas características de hidrofobicidade moderada (LAS, DCF, IBU e PRO) e alta (TCS).

Na fase I de operação do EGSB, ocorreu maior remoção de TCS ($72\pm 17\%$), sendo que grande parte dessa remoção foi devido a sua adsorção no lodo (40%), que foi a maior dentre todos os compostos avaliados. Apesar da maior remoção de TCS, o composto que foi mais degradado na fase I foi o LAS, com mais de 50% da sua remoção atribuída a degradação. Na fase II, o composto melhor removido e degradado também foi o LAS, com $65\pm 12\%$, dos quais aproximadamente 60% foram atribuídos a degradação. Isso ocorreu, provavelmente, devido a molécula de LAS ser constituída de grupos funcionais doadores de elétrons e, conseqüentemente, pode ser mais facilmente degradado em comparação aos outros compostos. Enquanto isso, o composto mais adsorvido na fase II foi o DCF (23%), devido a maior concentração do fármaco no afluente ao EGSB nesta fase de operação e, conseqüentemente, maior disponibilidade de suas moléculas para preenchimento dos sítios ativos do lodo.

O uso de etanol na fase III favoreceu maior remoção de DCF, IBU e TCS (compostos constituídos de grupos funcionais receptores de elétrons) devido a indução do cometabolismo. Dentre os compostos, maior remoção e degradação foi obtida para TCS, seguido de IBU e DCF. A adsorção na fase III foi menor que 3% para todos os compostos, com o LAS sendo o mais adsorvido no lodo granular. Adicionalmente, para LAS e PRO (compostos constituídos de grupos funcionais doadores de elétrons), o uso do cossubstrato de fácil assimilação resultou em competição por substrato e desfavoreceu a remoção.

O lodo do EGSB foi constituído de microrganismos importantes para digestão anaeróbia de esgoto sanitário contendo LAS, DCF, IBU, PRO e TCS, com vias metabólicas relacionadas a ω e β -oxidação, dessulfonação, clivagem de anel aromático e descloração redutiva. O emprego de etanol favoreceu microrganismos que realizam tais atividades metabólicas e maior diversidade microbiana, demonstrando ser estratégia para biorremediação de micropoluentes emergentes.

A abundância relativa de *Methanosaeta* diminuiu ao longo da operação do EGSB devido ao aumento de bactérias fermentativas, de BRS (que, provavelmente, competiram pelo ácido acético) e à prolongada exposição a compostos tóxicos. Enquanto isso, a abundância relativa

de *Methanobacterium* aumentou devido ao seu metabolismo versátil e resistência à ambientes hostis, como o EGSB alimentado com esgoto sanitário.

7. Respostas às hipóteses

A partir dos resultados, bem como baseando nos objetivos inicialmente propostos, pôde-se responder as hipóteses levantadas no início desta pesquisa:

Hipótese 1: Diferentes concentrações de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário podem influenciar no potencial metanogênico.

- A hipótese 1 foi atendida, sendo que o aumento da concentração de DCF e IBU favoreceu maior produção de metano, enquanto a de PRO e TCS diminuiu. Entretanto, deve-se destacar que para PRO, a menor produção de metano e remoção do fármaco ocorreu para $55,0 \pm 1,3$ mgPRO L⁻¹, enquanto de TCS para $5,0 \pm 0,1$ mgTCS L⁻¹. Dessa forma, a realização do objetivo 1 (*Avaliar o potencial metanogênico de lodo granular e a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário submetidos a diferentes concentrações dos compostos em reatores em bateladas*) contribuiu para responder a hipótese 1 e para a seleção da concentração de TCS e PRO a ser utilizada nos ensaios com cossustratos metabólicos.

Hipótese 2: A adição de cossustratos metabólicos pode favorecer a produção de metano e a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário.

- Cumprindo o objetivo 2 (*Avaliar o potencial metanogênico de lodo granular e a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário na presença dos cossustratos etanol, metanol e fumarato em reatores em bateladas*), pode-se inferir que a hipótese 2 foi atendida e melhor evidenciada para o uso de etanol. Todavia, deve-se destacar que para PRO, sua maior remoção foi para $28,5 \pm 0,5$ mgPRO L⁻¹ sem uso de cossustratos, devido a biodisponibilidade de sua molécula e favorecimento do cometabolismo a partir da matéria orgânica do esgoto sanitário. Mas, para condição de menor produção de metano e remoção de PRO ($55,0 \pm 1,3$ mgPRO L⁻¹), o uso dos cossustratos, e especialmente de etanol, favoreceu a produção de metano e remoção do fármaco. Além disso, cumprindo o objetivo 5 (*Caracterizar as populações de bactérias e arqueias dos reatores em batelada de maior remoção de DCF, IBU, PRO e TCS*), pode-se observar que etanol favoreceu

microrganismos com vias metabólicas importantes para a digestão anaeróbia e possivelmente envolvidas na degradação dos compostos. Adicionalmente, a realização dos objetivos 2 e 5 contribuiu para a seleção do cossustrato etanol a ser empregado ao reator EGSB em escala aumentada.

Hipótese 3: Alterações no TDH de operação de reator EGSB podem influenciar na remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário.

- Cumprindo o objetivo 3 (*Avaliar a remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário empregando diferentes TDH em reator EGSB em escala aumentada*), pode-se inferir que a hipótese 3 foi descartada, pois não foi observada diferença significativa das remoções de DCF, IBU, PRO e LAS quando comparadas as fases I e II, com TDH de 36h e 20h, respectivamente. Apesar de TCS ter sido melhor removido na fase I que na fase II, esse resultado foi atribuído a sua característica hidrofóbica, que levou a maior adsorção no lodo do reator EGSB durante a fase I.

Hipótese 4: O emprego de etanol em reator EGSB pode favorecer determinadas populações microbianas em detrimento de outras e melhorar a remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário.

- Cumprido o objetivo 4 (*Avaliar a influência do etanol na remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário em reator EGSB em escala aumentada*) e o objetivo 5 (*Caracterizar as populações de bactérias e arqueias de todas as fases de operação do reator EGSB em escala aumentada alimentado com esgoto sanitário*), foi possível inferir que a hipótese 4 foi parcialmente atendida. O uso de etanol favoreceu maior diversidade microbiana e gêneros bacterianos capazes de realizar etapas metabólicas de degradação dos compostos. Esse aspecto foi melhor evidenciado para DCF, IBU e TCS, para os quais a adição de etanol favoreceu a remoção cometabólica dos micropoluentes emergentes. Para LAS e PRO houve, provavelmente, competição entre os compostos com o substrato de fácil assimilação etanol, o que desfavoreceu a remoção de LAS e PRO.

Um sumário com a descrição das hipóteses, principais resultados e conclusões para cada uma delas é apresentado na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 – Descrição das hipóteses, resultados obtidos e conclusões.

| Reator | Hipótese | Descrição | Resultado | Conclusão da hipótese |
|-----------------|--------------|--|---|-----------------------|
| Batelada | Hipótese I | Diferentes concentrações de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário podem influenciar no potencial metanogênico | O aumento da concentração de DCF e IBU favoreceu maior produção de metano, enquanto a de PRO e TCS desfavoreceu | ✓ |
| | Hipótese II | A adição de cossustratos metabólicos pode favorecer a produção de metano e a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário | O uso de cossustratos favoreceu a produção de metano e remoção dos compostos de interesse, especialmente o uso de etanol | ✓ |
| ESGB | Hipótese III | Alterações no TDH de operação de reator EGSB podem influenciar na remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário | A redução do TDH de 36h para 20h não influenciou na remoção de DCF, IBU, PRO e LAS A maior remoção de TCS para TDH de 36h foi devido sua maior adsorção na fase inicial de operação do EGSB | ✗ |
| | Hipótese IV | O emprego de etanol em reator EGSB pode favorecer determinadas populações microbianas em detrimento de outras e melhorar a remoção de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS em esgoto sanitário | O uso de etanol favoreceu maior diversidade microbiana e gêneros bacterianos capazes de realizar etapas metabólicas de degradação dos compostos de interesse. Entretanto, esse aspecto foi melhor evidenciado para DCF, IBU e TCS. Para LAS e PRO o uso de etanol desfavoreceu a remoção. | ✓ |

Nota: ✓ = Hipótese confirmada; ✓ = Hipótese parcialmente confirmada; ✗ = Hipótese rejeitada

8. Conclusões

- O uso dos cossustratos etanol, metanol e fumarato nos reatores em batelada favoreceu a produção de metano de lodo granular anaeróbio na presença de todos os micropoluentes emergentes de interesse;
- Na presença de etanol, com todos os micropoluentes, observou-se maior produção de metano devido a formação de substratos prontamente disponíveis ao consórcio anaeróbio, sendo ele selecionado para ser empregado ao reator EGSB em escala aumentada;
- Nos reatores em batelada, o aumento da concentração de DCF e IBU favoreceu maior produção de metano, enquanto o aumento da concentração de PRO e TCS teve efeito contrário;
- Nos reatores em batelada com DCF e etanol obteve-se maior produção de metano ($11.530 \pm 368 \mu\text{molCH}_4$), em função da estrutura química do DCF composta por grupo fenilacético, que propiciou maior liberação de acetato para comunidade microbiana anaeróbia;
- Nos reatores em batelada com IBU e etanol obteve-se a segunda maior produção de metano ($10.583 \pm 512 \mu\text{molCH}_4$), porém com a menor remoção ($18,72 \pm 1,60\%$ para $43,42 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$) dentre todos os compostos, sendo o micropoluente emergente mais recalcitrante dentre todos outros avaliados neste estudo;
- Nos reatores em batelada com PRO sem cossustrato, o aumento da concentração em até $28,5 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ favoreceu produção de metano ($8.102 \pm 113 \mu\text{molCH}_4$) e remoção do fármaco ($89,1 \pm 0,1\%$), devido a biodisponibilidade de PRO e favorecimento do cometabolismo a partir de compostos biodegradáveis do esgoto sanitário. Por outro lado, $55,0 \pm 1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de PRO não favoreceu a produção de metano ($704 \pm 52 \mu\text{molCH}_4$) e sua remoção ($9,0 \pm 0,5\%$), devido ao aumento da biodisponibilidade de sua molécula que, provavelmente, resultou em toxicidade a comunidade microbiana;
- Para TCS, o limiar de concentração ($5,0 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) para diminuição da produção de metano ($423 \pm 18 \mu\text{molCH}_4$) e remoção ($59,1 \pm 0,7\%$), nos reatores em batelada, foi o menor dentre todos os compostos avaliados neste estudo. Isso foi atribuído a maior tendência de TCS em adsorver no lodo e, conseqüentemente, maior toxicidade a comunidade microbiana anaeróbia;
- Não houve diferença significativa das remoções de DCF, IBU, PRO e LAS para TDH

de 36h e 20h, o que torna a tecnologia EGSB vantajosa no ponto de vista econômico;

- Dentre os micropoluentes emergentes avaliados no reator EGSB sem cossustrato, o LAS foi melhor removido, devido a sua molécula ser constituída de grupos funcionais doares de elétrons e, conseqüentemente, pode ser mais facilmente degradado em comparação aos outros compostos;
- Para o TCS, maior remoção foi observada em TDH de 36h devido a sua maior adsorção nesta fase inicial de operação do EGSB, que ocorreu porque a molécula de TCS é mais hidrofóbica em comparação as moléculas de DCF, IBU, PRO e LAS e, portanto, TCS é mais propenso a particionar em lodo biológico;
- O uso do etanol no reator EGSB favoreceu a remoção cometabólica de TCS, seguido de IBU e DCF. Entretanto, a provável competição com o substrato de fácil assimilação etanol desfavoreceu a remoção de LAS e PRO;
- A partir da caracterização microbiana dos reatores em batelada, em conjunto com uma extensa busca na literatura disponível, foi possível correlacionar vias metabólicas importantes da digestão anaeróbia com as possivelmente envolvidas no processo de degradação anaeróbia de DCF, IBU, PRO e TCS;
- As principais bactérias identificadas nos reatores em batelada contendo DCF e etanol e IBU e etanol foram *Smithella*, *Sulfuricurvum* e *Synthophus*, sendo responsáveis por realizar clivagem de anel aromático, descloração redutiva, β -oxidação e metabolizar ácidos graxos. Em relação ao Domínio Archaea foi observada maior abundância relativa de *Methanosaeta*;
- Nos reatores em batelada contendo TCS e etanol, as principais bactérias identificadas foram as pertencentes ao Filo Chloroflexi e aos gêneros *Longilinea*, *Arcobacter*, *Mesotoga* e *Sulfuricurvum*. Trata-se de microrganismos com vias metabólicas relacionadas a degradação de organoclorados e podem exercer papel importante para a remoção do bactericida. Em relação ao Domínio Archaea, *Methanosaeta* foi dominante devido ao fornecimento de acetato oriundo da degradação de etanol;
- Nos reatores em batelada contendo PRO e sem cossustrato, o gênero mais abundante foi *VadinBC27*, que parece desempenhar papel importante na degradação do fármaco. Em relação ao Domínio Archaea o gênero mais abundante foi *Methanobacterium*, provavelmente,

devido a sua capacidade de adaptação aos estresses abióticos;

- O uso de etanol no EGSB em escala aumentada favoreceu maior diversidade microbiana e gêneros bacterianos capazes de realizar etapas metabólicas de degradação dos compostos de interesse, tais como ω e β -oxidação, dessulfonação, descloração redutiva e clivagem de anel aromático;
- Na fase I de operação do reator EGSB em escala aumentada, bactérias semelhantes a *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Macellibacteroides*, *Syntrophus*, *Blvii28_wastewater-sludge_group* e *Bacteroides* foram mais abundantes;
- Na fase II, *Syntrophobacter* foi mais abundante, provavelmente, devido a maior concentração de DCF e IBU no afluente ao EGSB em comparação as demais fases;
- Na fase III, *Smithella* e *Caldisericum* foram mais abundantes. Bactérias semelhantes a *Smithella*, provavelmente, foram favorecidas devido a maior concentração de ácido propiônico no afluente ao EGSB, enquanto que *Caldisericum*, provavelmente, devido a maior concentração de matéria orgânica no afluente ao reator, que ocorreu devido ao uso de etanol;
- Para o Domínio Archaea, ao longo da operação do EGSB, *Methanosaeta* foram desfavorecidas devido ao aumento de bactérias fermentativas, de BRS (que, provavelmente, competiram pelo ácido acético) e à prolongada exposição a compostos tóxicos do esgoto sanitário. Enquanto isso, *Methanobacterium* se mantiveram e/ou foram favorecidas devido ao seu metabolismo versátil e resistência à ambientes hostis.

Dessa forma, pode-se tirar uma conclusão geral do trabalho:

O uso de cossustratos metabólicos, e especialmente o etanol, pode ser opção para a biorremediação de DCF, IBU, PRO, TCS e LAS sob condições anaeróbias. Por meio desta estratégia, obteve-se melhores resultados devido ao fornecimento de carbono e energia para o desenvolvimento de consórcio microbiano de ampla capacidade metabólica e favorecimento de ambiente redutor. Assim, etanol pode auxiliar na redução das moléculas desses contaminantes e também favorecer a remoção por cometabolismo. Além disso, a tecnologia EGSB é possibilidade para o tratamento de águas residuárias contendo DCF, IBU, PRO, TCS e LAS e pode ser operado em TDH de 20h, uma vez que seu regime de mistura completa e recirculação do efluente promovem a diluição do afluente. Esse diferencial do reator EGSB, potencializa a

remoção dos poluentes recalcitrantes e tóxicos ao sistema anaeróbio.

9. Sugestões para trabalhos futuros

Em função dos resultados obtidos, bem como de leituras recentes sobre biorremediação de micropoluentes emergentes, algumas temáticas com potencial para serem exploradas em pesquisas futuras são sugeridas:

- Aplicação de *design* experimental exploratório para avaliar diferentes quantidades de etanol, bem como outras variáveis, como pH, concentração de micronutrientes e relação C/N para a remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em esgoto sanitário.
- Aplicação de *design* fatorial para otimizar produção de metano a partir de esgoto sanitário, etanol, DCF, IBU, PRO, TCS e LAS como substrato;
- Aplicação das condições ótimas obtidas no *design* exploratório e fatorial em reator contínuo, como reator EGSB em escala aumentada;
- Realizar análise taxonômica e de expressão gênica na comunidade microbiana dos reatores de maior remoção dos micropoluentes emergentes;
- Avaliar a presença de outros micropoluentes emergentes, como edulcorantes artificiais, em esgoto sanitário e a eficiência de remoção desses compostos em reator de escala plena de ETE.

10. Referências bibliográficas

ABIPLA/SIPLA. **Anuário da Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Higiene e Limpeza Doméstica e Profissional.**

APHA, AWWA, WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 21th ed, 2005.

ACETI, D. J.; FERRY, J. G. Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Evidence for regulation of synthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 30, p. 15444–15448, 1988.

ALVARINO, T. et al. 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, ago. 2014.

ALVES, I. et al. Determining the distribution of granule diameter from biological sludge. **MethodsX**, v. 5, p. 727–736, 2018.

AN, J. et al. Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 751–757, set. 2009.

ANGERER, J. et al. **European Commission: Opinion on triclosan - Antimicrobial resistance** Scientific Committee on Consumer Safety SCCS, 2010.

AQUINO, S. F. DE; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE 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, set. 2013.

ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; HINO, T. Effect of the Addition of Fumarate on Methane Production by Ruminal Microorganisms In Vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 780–787, abr. 1999.

BAENA-NOGUERAS, R. M. et al. Determination of Pharmaceuticals in Coastal Systems Using Solid Phase Extraction (SPE) Followed by Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). **Current Analytical Chemistry**, v. 12, n. 3,

p. 183–201, 5 maio 2016.

BALCKE, G. U. et al. Chlorobenzene biodegradation under consecutive aerobic-anaerobic conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, n. 1, p. 109–120, jul. 2004.

BARESEL, C. et al. Pharmaceutical residues and other emerging substances in the effluent of sewage treatment plants: Review on concentrations, quantification, behaviour, and removal options. **IVL Swedish Environmental Research Institute**, n. number B2226, p. 60, 2015.

BEHERA, S. K. et al. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 20, p. 4351–4360, 2011.

BENDZ, D. et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 195–204, jul. 2005.

BERGÉ, A. et al. Occurrence of multi-class surfactants in urban wastewater: contribution of a healthcare facility to the pollution transported into the sewerage system. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–11, 23 out. 2017.

BERNARD, G. R. et al. The Effects of Ibuprofen on the Physiology and Survival of Patients with Sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 13, p. 912–918, 27 mar. 1997.

BESTER, K. Fate of Triclosan and Triclosan-Methyl in Sewage Treatment Plants and Surface Waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 9–17, 9 jul. 2005.

BHATIA, S. K. et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) production from engineered *Ralstonia eutropha* using synthetic and anaerobically digested food waste derived volatile fatty acids. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1–10, jul. 2019.

BI, R. et al. Sensitivities of seven algal species to triclosan, fluoxetine and their mixtures. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15361, 18 dez. 2018.

BOKULICH, N. A. et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, p. 57–59, 1 jan. 2013.

BOLL, M. Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1707, n. 1, p. 34–50, fev. 2005.

BORGMANN, U. et al. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1278–1283, jan. 2007.

BOSSHARD, P. P.; ZBINDEN, R.; ALTWEGG, M. *Turicibacter sanguinis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, Gram-positive bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1263–1266, 1 jul. 2002.

BRAGA, J. K.; VARESCHE, M. B. A. Commercial Laundry Water Characterisation. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. January, p. 8–16, 2014.

BRENNER, D. J. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria**. 2. ed. Michigan, USA: [s.n.].

BRORSTRÖM-LUNDÉN, E. et al. **Measurements of Sucralose in the Swedish Screening program 2007 - PART I; Sucralose in surface waters and STP samples**. Swedish Environmental Research Institute, 2008.

BUENO, M. D. L. Á. B. R. D. H.; BOTELLA, N. B.; RICO, D. P. **MECHANISMS INVOLVED IN THE REMOVAL OF EMERGING CONTAMINANTS BY A COMBINED UASB-MBR SYSTEM**. 8 maio 2018 Disponível em:
<<http://library.witpress.com/viewpaper.asp?pcode=UG18-027-1>>

BUTH, J. M. et al. Dioxin Photoproducts of Triclosan and Its Chlorinated Derivatives in Sediment Cores. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 12, p. 4545–4551, 15 jun. 2010.

BUTKOVSKYI, A. et al. Fate of pharmaceuticals in full-scale source separated sanitation system. **Water Research**, v. 85, p. 384–392, nov. 2015.

CAMACHO-MUÑOZ, D. et al. Occurrence of surfactants in wastewater: Hourly and seasonal variations in urban and industrial wastewaters from Seville (Southern Spain). **Science of The Total Environment**, v. 468–469, p. 977–984, jan. 2014.

CAMARGO, M. C. et al. The Problem of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A

Systematic Review in Latin America. **The American journal of gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 485–495, 2014.

CAMPANHA, M. B. **Contaminantes emergentes: ocorrência e distribuição espaço-temporal no Rio do Monjolinho e avaliação da remoção pela Estação de Tratamento de Esgotos de São Carlos**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2015.

CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7936–7947, 18 maio 2015.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement_1, p. 4516–4522, 15 mar. 2011.

CAREY, D. E. et al. Chronic exposure to triclosan sustains microbial community shifts and alters antibiotic resistance gene levels in anaerobic digesters. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 8, p. 1060–1067, 2016.

CARMONA, M. et al. Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 1, p. 71–133, 1 mar. 2009.

CENTURION, V. B. et al. Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor : The influence of surfactant concentration on microbial diversity. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 127, n. November 2017, p. 77–86, 2018.

CETESB. **Portal Tratamento de Água Notícias: CETESB inicia monitoramento de compostos anti-inflamatórios na água**, 2018. Disponível em:

<https://www.tratamentodeagua.com.br/cetesb-anti-inflamatorios/?utm_source=Newsletter&utm_medium=EMAIL_RD&utm_campaign=Geral_Junho05&utm_term=CETESB&utm_content=CETESB>

CHAKRABORTY, R. et al. Anaerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Compounds by Dechloromonas Strain RCB. **Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8649–8655, 2005.

CHEN, C. et al. Evaluation of an up-flow anaerobic sludge bed (UASB) reactor containing diatomite and maifanite for the improved treatment of petroleum wastewater. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 620–627, nov. 2017.

CHEN, F. et al. Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 6, p. 1490–1498, jun. 2011a.

CHEN, H.-W. et al. Isolation and characterization of a chlorate-reducing bacterium *Ochrobactrum anthropi* XM-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 380, p. 120873, dez. 2019.

CHEN, H. et al. Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 1–8, out. 2014.

CHEN, T. et al. Performance of ANAMMOX-EGSB reactor. **Desalination**, v. 278, n. 1–3, p. 281–287, set. 2011b.

CHENG, L. et al. Progressive Degradation of Crude Oil n-Alkanes Coupled to Methane Production under Mesophilic and Thermophilic Conditions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113253, 19 nov. 2014.

CHEVILLOT, F. et al. Accumulation and sublethal effects of triclosan and its transformation product methyl-triclosan in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to environmental concentrations in an artificial soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 7, p. 1940–1948, jul. 2018.

Climatologia - São Carlos - SP. Disponível em:

<<https://www.climatempo.com.br/climatologia/549/saocarlos-sp>>. Acesso em: 11 jan. 2020.

COATES, J. D. et al. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. **Nature**, v. 411, n. 6841, p. 1039–1043, jun. 2001.

COMPANY, B. & ENERGY, G. **Estudo do potencial de diversificação da indústria química brasileira**. São Paulo: [s.n.].

CORADA-FERNÁNDEZ, C. et al. Occurrence and spatial distribution of emerging

contaminants in the unsaturated zone. Case study: Guadalete River basin (Cadiz, Spain). **Chemosphere**, v. 119, p. S131–S137, jan. 2015.

CORCOLL, N. et al. Effects of flow intermittency and pharmaceutical exposure on the structure and metabolism of stream biofilms. **Science of The Total Environment**, v. 503–504, p. 159–170, jan. 2015.

COUTU, S. et al. Temporal dynamics of antibiotics in wastewater treatment plant influent. **Science of The Total Environment**, v. 458–460, p. 20–26, ago. 2013.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment International**, v. 28, n. 5, p. 337–348, nov. 2002.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; ZIELIŃSKA, M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 66, 1 abr. 2016.

DAHLE, H.; BIRKELAND, N.-K. *Thermovirga lienii* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1539–1545, 1 jul. 2006.

DAI, R. et al. Understanding azo dye anaerobic bio-decolorization with artificial redox mediator supplement: Considering the methane production. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 799–808, fev. 2018.

DAI, Y.-R. et al. Acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex from *Archaeoglobus fulgidus*. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 6, p. 525–529, 15 maio 1998.

DE BOK, F. A. M. et al. Pathway of Propionate Oxidation by a Syntrophic Culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1800–1804, 1 abr. 2001.

DE GARCÍA, S. O.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; IRUSTA-MATA, R. Dose–response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 1, p. 141–162, 30 jan. 2016.

DE GRAAFF, M. S. et al. 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, jan. 2011.

DE WEVER, H. et al. Reductive Dehalogenation of Trichloroacetic Acid by *Trichlorobacter thiogenes* gen. nov., sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2297–2301, 1 jun. 2000.

DELFORNO, T. P. et al. Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 103–109, mar. 2012.

DELFORNO, T. P. et al. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 37–45, set. 2015.

DELFORNO, T. P. et al. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, fev. 2017a.

DELFORNO, T. P. et al. 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. e00443, jun. 2017b.

DELFORNO, T. P. et al. Comparative metatranscriptomic analysis of anaerobic digesters treating anionic surfactant contaminated wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 649, p. 482–494, fev. 2019.

DELFORNO, T. P. et al. Anaerobic reactor applied to laundry wastewater treatment: Unveiling the microbial community by gene and genome-centric approaches. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 149, p. 104916, abr. 2020.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 1 jul. 2006.

DIETRICH, S. et al. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. **Chemosphere**, v. 79,

n. 1, p. 60–66, mar. 2010.

DIEZ-GONZALEZ, F.; RUSSELL, J. B.; HUNTER, J. B. The acetate kinase of *Clostridium acetobutylicum* strain P262. **Archives of Microbiology**, v. 166, n. 6, p. 418–420, 17 jan. 1997.

DOMARADZKA, D. et al. Cometabolic Degradation of Naproxen by *Planococcus* sp. Strain S5. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 9, p. 297, 14 set. 2015.

DONACHIE, S. P. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 55, n. 3, p. 1271–1277, 1 maio 2005.

DORNELLES, H. DE S. et al. 4-Nonylphenol degradation changes microbial community of scale-up Anaerobic Fluidized Bed Reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 267, n. April, p. 110575, ago. 2020.

DU, S. et al. Microbial dynamics and performance in a microbial electrolysis cell-anaerobic membrane bioreactor. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE A**, v. 20, n. 7, p. 533–545, 8 jul. 2019.

DUARTE, I. C. S. et al. Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1360–1367, dez. 2006.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 15 ago. 2011.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 996–998, 18 out. 2013.

EMNET, P. et al. Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base. **Environmental Research**, v. 136, p. 331–342, jan. 2015.

ESPOSITO, G. et al. Enhanced bio-methane production from co-digestion of different organic wastes. **Environmental Technology**, v. 33, n. 24, p. 2733–2740, dez. 2012.

ESTEBAN, S. et al. Presence of endocrine disruptors in freshwater in the northern Antarctic Peninsula region. **Environmental Research**, v. 147, p. 179–192, maio 2016.

ESTEVE-NUNEZ, A.; CABALLERO, A.; RAMOS, J. L. Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 3, p. 335–352, 1 set. 2001.

ESTEVEZ, E. et al. Ibuprofen adsorption in four agricultural volcanic soils. **Science of The Total Environment**, v. 468–469, n. January 2012, p. 406–414, jan. 2014.

EUROPEAN COMMISSION. **Directive of the European Parliament and of the Council - amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy - COM(2011) 876 final 2011/0429 (COD)**. [s.l.: s.n.].

EZAKI, T. et al. Proposal of the genera Anaerococcus gen. nov., Peptoniphilus gen. nov. and Gallicola gen. nov. for members of the genus Peptostreptococcus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1521–1528, 1 jul. 2001.

FÁBEROVÁ, M. et al. The influence of selected pharmaceuticals on biogas production from laboratory and real anaerobic sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, 5 set. 2019.

FALFUSHYNSKA, H. I. et al. Diversity of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 164, p. 51–58, ago. 2014.

FAN, C. et al. Triclosan enhances short-chain fatty acid production from sludge fermentation by elevating transcriptional activity of acidogenesis bacteria. **Chemical Engineering Journal**, v. 384, p. 123285, mar. 2020.

FARES, A. Winter cardiovascular diseases phenomenon. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 266, 2013.

FARIA, C. V. DE et al. Evaluation of anionic surfactant removal by anaerobic degradation of commercial laundry wastewater and domestic sewage. **Environmental Technology**, v. 3330, n. December, p. 1–9, 13 dez. 2017.

FENT, K.; WESTON, A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals.

Aquatic Toxicology, v. 76, n. 2, p. 122–159, 10 fev. 2006.

FERNANDEZ-FONTAINA, E. et al. Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitrataion and heterotrophic conditions. **Science of The Total Environment**, v. 541, p. 1439–1447, jan. 2016.

FERNÁNDEZ, C.; CARBONELL, G.; BABÍN, M. Effects of individual and a mixture of pharmaceuticals and personal-care products on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2). **Journal of Applied Toxicology**, p. n/a-n/a, jun. 2012.

FERRY, J. G. Acetate kinase and phosphotransacetylase. In: **Methods in Enzymology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 494p. 219–231.

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, 28 ago. 2014.

FLORENCIO, L.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G. Substrate competition between methanogens and acetogens during the degradation of methanol in UASB reactors. **Water Research**, v. 29, n. 3, p. 915–922, mar. 1995.

FOUNTOULAKIS, M. et al. Toxic effect of pharmaceuticals on methanogenesis. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 335–340, 2004.

FOUNTOULAKIS, M. S.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. The effect of pharmaceuticals on the kinetics of methanogenesis and acetogenesis. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7083–7090, out. 2008.

FRANKLIN, A. M. et al. Uptake of Three Antibiotics and an Antiepileptic Drug by Wheat Crops Spray Irrigated with Wastewater Treatment Plant Effluent. **Journal of Environmental Quality**, v. 45, n. 2, p. 546–554, mar. 2016.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 803–816, 3 nov. 2011.

GAGO-FERRERO, P. et al. Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography–

tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 15, p. 4287–4297, 26 jun. 2015.

GALLARDO-ALTAMIRANO, M. J. et al. Linking microbial diversity and population dynamics to the removal efficiency of pharmaceutically active compounds (PhACs) in an anaerobic/anoxic/aerobic (A2O) system. **Chemosphere**, v. 233, p. 828–842, out. 2019.

GANGADHARAN PUTHIYA VEETIL, P. et al. Degradation of Triclosan under Aerobic, Anoxic, and Anaerobic Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1603–1612, 11 jul. 2012.

GARCÍA-CAMBERO, J. . et al. Environmental concentrations of the cocaine metabolite benzoylecgonine induced sublethal toxicity in the development of plants but not in a zebrafish embryo–larval model. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 866–872, dez. 2015.

GARCÍA-ESPINOZA, J. D.; MIJAYLOVA NACHEVA, P. Effect of electrolytes on the simultaneous electrochemical oxidation of sulfamethoxazole, propranolol and carbamazepine: behaviors, by-products and acute toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6855–6867, 11 mar. 2019.

GARCÍA, M. . et al. Structure–activity relationships for association of linear alkylbenzene sulfonates with activated sludge. **Chemosphere**, v. 49, n. 3, p. 279–286, out. 2002.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; TIMOTHY, L. Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In: SPRINGER (Ed.). . **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Boston: [s.n.]. p. 1–574.

GAVALA, H. N.; AHRING, B. K. Inhibition of the anaerobic digestion process by linear alkylbenzene sulfonates. v. 13, p. 201–209, 2002.

GENIN, S.; BOUCHER, C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 107–134, set. 2004.

GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. 1, p. 67–89, 8 set. 2012.

GHATTAS, A.-K. et al. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. **Water Research**, v. 116, p. 268–295, jun. 2017.

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

GIBSON, J.; S. HARWOOD, C. Metabolic Diversity in Aromatic Compound Utilization by Anaerobic Microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 345–369, out. 2002.

GODON, J. J. et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2802–2813, 1997.

GÓES, L. G. B. et al. Typical epidemiology of respiratory virus infections in a Brazilian slum. **Journal of Medical Virology**, n. September, p. jmv.25636, 9 dez. 2019.

GÖKER, M. et al. Genome sequence of the moderately thermophilic, amino-acid-degrading and sulfur-reducing bacterium *Thermovirga lienii* type strain (Cas60314T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 6, n. 2, p. 230–239, 4 maio 2012.

GÓMEZ-CANELA, C. et al. Targeted metabolomics of *Gammarus pulex* following controlled exposures to selected pharmaceuticals in water. **Science of The Total Environment**, v. 562, p. 777–788, ago. 2016.

GONZÁLEZ-ALONSO, S. et al. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 241–254, out. 2017.

GONZÁLEZ-BENÍTEZ, N.; MOLINA, M. C.; ARRAYÁS, M. Empirical Evidence and Mathematical Modelling of Carbamazepine Degradative Kinetics by a Wood-Rotting Microbial Consortium. **Waste and Biomass Valorization**, 1 abr. 2020.

GONZALEZ-GIL, L. et al. Is anaerobic digestion effective for the removal of organic micropollutants and biological activities from sewage sludge? **Water Research**, v. 102, p. 211–220, out. 2016.

GONZALEZ-GIL, L. et al. Role of methanogenesis on the biotransformation of organic micropollutants during anaerobic digestion. **Science of The Total Environment**, v. 622–623, p. 459–466, maio 2018.

GONZALEZ-GIL, L. et al. Reversibility of enzymatic reactions might limit biotransformation

of organic micropollutants. **Science of The Total Environment**, v. 665, p. 574–578, maio 2019.

GONZALEZ-GIL, L.; CARBALLA, M.; LEMA, J. M. Cometabolic Enzymatic Transformation of Organic Micropollutants under Methanogenic Conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 5, p. 2963–2971, 7 mar. 2017.

GONZALEZ-REY, M. et al. Effects of active pharmaceutical ingredients mixtures in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 153, p. 12–26, ago. 2014.

GONZALEZ-REY, M.; BEBIANNO, M. J. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 361–371, mar. 2012.

GORRELL, A.; FERRY, J. G. Investigation of the *Methanosarcina thermophila* acetate kinase mechanism by fluorescence quenching. **Biochemistry**, v. 46, n. 49, p. 14170–14176, dez. 2007.

GRABOWSKI, A. *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 55, n. 3, p. 1113–1121, 1 maio 2005.

GRACIA-LOR, E. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. **Chemosphere**, v. 87, n. 5, p. 453–462, abr. 2012.

GRANATTO, C. F. et al. **Influence Of Co-digestion With Laundry Wastewater On Surfactant Removal From Domestic Sewage Using Anaerobic Reactors**. (IWA, Ed.). The 14th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies. **Anais**. Florianópolis: 2017.

GRANATTO, C. F. et al. **Application of expanded granular sludge and fluidized bed reactors in pilot scale for the removal of surfactant LAS in sanitary sewage**. XIII Talyer y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia - DAAL XIII. **Anais**. Medellín, Colômbia: 2018.

GRANATTO, C. F. et al. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 138, p. 23–32, 2019.

GRANATTO, C. F. et al. Methanogenic potential and organic matter removal of anaerobic reactors treating sanitary sewage containing triclosan and propranolol. **DAAL - The Latin American Meetings on Anaerobic Digestion**, v. XIV, 2020a.

GRANATTO, C. F. et al. Methanogenic potential of diclofenac and ibuprofen in sanitary sewage using metabolic cosubstrates. **Science of The Total Environment**, v. 742, p. 140530, jun. 2020b.

GROS, M. et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**, v. 36, n. 1, p. 15–26, jan. 2010.

GU, J.-D.; MITCHELL, R. Biodeterioration. In: **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer New York, 2006. p. 864–903.

GUNDRY, S. The primary care nurse's guide to winter respiratory disease. **Independent Nurse**, v. 2019, n. 2, p. 14–18, 2 fev. 2019.

GUO, J. et al. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 33, 14 dez. 2015.

GUPTA, R. S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 367–402, out. 2000.

GUTIÉRREZ, C. et al. Effect of soil properties, heavy metals and emerging contaminants in the soil nematodes diversity. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 184–194, jun. 2016.

HA, H. et al. Degradation of the long-resistant pharmaceutical compounds carbamazepine and diatrizoate using mixed microbial culture. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 51, n. 6, p. 467–471, 11 maio 2016.

HAAS, B. J. et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Genome Research**, v. 21, n. 3, p. 494–504, 1 mar. 2011.

- HAMMER, O.; HARPER, D.; RYAN, P. **PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis**, 2001.
- HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Boston, MA: Springer US, 1995. p. 19–54.
- HAN, C. et al. Complete genome sequence of the sulfur compounds oxidizing chemolithoautotroph *Sulfuricurvum kujiense* type strain (YK-1T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 6, n. 1, p. 94–103, 5 mar. 2012.
- HARADA, H.; VERMURA, S.; MOMONOI, K. Interaction between sulphate reducing bacteria and methano producing bacteria in a UASB reactor fed with low strength wastes containing levels of sulphate. **Water Research**, v. 28, n. 2, p. 355–367, 1994.
- HARWOOD, C. et al. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 439–458, dez. 1999.
- HARWOOD, C. S.; GIBSON, J. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 301–309, jan. 1997.
- HE, P. et al. Continuity of biochar-associated biofilm in anaerobic digestion. **Chemical Engineering Journal**, v. 390, n. 124605, p. 1–12, 2020.
- HEIDELBERG, J. F. et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 554–559, 11 maio 2004.
- HEIDER, J.; FUCH, G. Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, n. 1, p. 577–596, 1997.
- HESS, M. et al. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. **Science**, v. 331, n. 6016, p. 463–467, 28 jan. 2011.
- HEYLEN, K. et al. Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2637–2643, 1 abr. 2006.
- HOLLIGER, C. et al. Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively

dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1636–1644, 1992.

HOUF, K. *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 55, n. 2, p. 713–717, 1 mar. 2005.

HULTMAN, J. et al. Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 4, p. 1–10, 1 abr. 2018.

IKEGAM, K. et al. Complete Genome Sequence of *Petrimonas* sp. Strain IBARAKI, Assembled from the Metagenome Data of a Culture Containing *Dehalococcoides* spp. **American Society for Microbiology**, p. 1–2, 2018.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia: Disponível em:

<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf>.

Acesso em: 11 jan. 2020.

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J. Surfactants in the Environment. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 95–110, 1 jan. 2010.

IYER, P.; FERRY, J. G. Acetate Kinase From *Methanosarcina thermophila*, a Key Enzyme for Methanogenesis. In: **Microbial Enzymes and Biotransformations**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. v. 17p. 239–246.

JABARI, L. et al. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt_10, p. 2522–2527, 1 out. 2012.

JANARTHANAN, O. M. et al. Fluxes in PHA-storing microbial communities during enrichment and biopolymer accumulation processes. **New Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 61–72, jan. 2016.

JELIC, A. et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1165–1176, jan. 2011.

JELIC, A. et al. Occurrence and elimination of pharmaceuticals during conventional

wastewater treatment. In: GUASCH, H.; GINEBREDA, A.; GEISZINGER, A. (Eds.). .

Emerging and Priority Pollutants in Rivers: Bringing Science into River Management Plans. 1. ed. Berlin: Springer, 2012. p. 1–24.

JEWELL, K. S. et al. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm–activated sludge processes. **Water Research**, v. 105, p. 559–567, nov. 2016.

JIA, Y. et al. Biotransformation of ibuprofen in biological sludge systems: Investigation of performance and mechanisms. **Water Research**, v. 170, p. 115303, mar. 2020.

JIANG, B. et al. Methanomethylovorans thermophila sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen from an anaerobic reactor fed with methanol. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 2465–2470, 1 nov. 2005.

JIN, Y. et al. Volatile fatty acids production from sacchari fi cation residue from food waste ethanol fermentation: Effect of pH and microbial community. **Bioresource Technology journal**, v. 292, n. 121957, p. 1–7, 2019.

JOSS, A. et al. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. **Water Research**, v. 39, n. 14, p. 3139–3152, set. 2005.

KALYUZHNYI, S. et al. Methanogenic biodegradation of aromatic amines. **Water Science and Technology**, v. 42, n. 5–6, p. 363–370, 1 set. 2000.

KÄMPFER, P.; LODDERS, N.; FALSEN, E. Hydrotalea flava gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera Chitinophaga, Sediminibacterium, Lacibacter, Flavihumibacter, Flavisolibacter, Niabella, Niastella, Segetibacter, Parasegetibacter, Terrimonas, Fer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 518–523, 1 mar. 2011.

KAMPMANN, K. et al. Unexpected Stability of Bacteroidetes and Firmicutes Communities in Laboratory Biogas Reactors Fed with Different Defined Substrates. **Environmental Microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2106–2119, 2012.

KARNJANAPIBOONWONG, A. et al. Occurrence of PPCPs at a Wastewater Treatment Plant and in Soil and Groundwater at a Land Application Site. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 216, n. 1–4, p. 257–273, 10 mar. 2011.

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.

KAYEMBE, K. et al. Inhibitory Effects of Phenolic Monomers on Methanogenesis in Anaerobic Digestion. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 32–41, 2013.

KEEN, O. S. et al. Dimer formation during UV photolysis of diclofenac. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1948–1956, nov. 2013.

KERTESZ, M. A. et al. Desulfonation of Linear Alkylbenzenesulfonate Surfactants and Related Compounds by Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2296–2303, 1994.

KIM, J. et al. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 227–232, 2009.

KIM, J.; LEE, C. Response of a continuous anaerobic digester to temperature transitions: A critical range for restructuring the microbial community structure and function. **Water Research**, v. 89, p. 241–251, fev. 2016.

KLEYWEGT, S. et al. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada — Occurrence and treatment efficiency. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 8, p. 1481–1488, mar. 2011.

KODAMA, Y. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 54, n. 6, p. 2297–2300, 1 nov. 2004.

KOSMA, C. I.; LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 466–467, p. 421–438, jan. 2014.

KOTSYURBENKO, O. R. . et al. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and

methanogenic populations in an acidic. **West-Siberian peat bog. Environ. Microbiol.**, v. 6, p. 1159–1173, 2004.

KRAH, D. et al. Micropollutant degradation via extracted native enzymes from activated sludge. **Water Research**, v. 95, p. 348–360, maio 2016.

KRZMARZICK, M. J. et al. Natural Niche for Organohalide-Respiring Chloroflexi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 393–401, 15 jan. 2012.

KRZMARZICK, M. J. et al. Diversity and Niche of Archaea in Bioremediation. **Archaea**, v. 2018, p. 1–17, 3 set. 2018.

KU, P. et al. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 166, p. 105–114, nov. 2014.

KUEVER, J. The Family Syntrophorhabdaceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 301–303.

KUMAR, A. G. et al. Influence of fermentation metabolites on redox potential in anaerobic digestion of proteinaceous solid wastes by *Synergistes* sp. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 4, p. 368–373, ago. 2010.

KUNG, J. W. et al. Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17687–17692, 20 out. 2009.

KUNG, J. W. et al. Reversible Biological Birch Reduction at an Extremely Low Redox Potential. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 28, p. 9850–9856, 21 jul. 2010.

KUNTZE, K. et al. 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1547–1556, jun. 2008.

KUO, C.-J. et al. A multi-omic analysis reveals the role of fumarate in regulating the

virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 3, p. 381, 7 mar. 2018.

LAANBROEK, H. J. et al. Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 329–334, 1984.

LARA-MARTÍN, P. A. et al. Anaerobic Degradation Pathway of Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) in Sulfate-Reducing Marine Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 5, p. 1670–1676, mar. 2010.

LAWRENCE, J. R. et al. Comparative microscale analysis of the effects of triclosan and triclocarban on the structure and function of river biofilm communities. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 10, p. 3307–3316, maio 2009.

LEVERRIER-PENNA, S. et al. Ibuprofen is deleterious for the development of first trimester human fetal ovary ex vivo. **Human Reproduction**, v. 33, n. 3, p. 482–493, 1 mar. 2018.

LEYDY, P. K. A. et al. Which route to take for diclofenac removal from water: Hydroxylation or direct photolysis? **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 382, n. April, p. 111879, set. 2019.

LI, A. et al. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 3, p. 1–17, 2013.

LI, S. et al. Removal of artificial sweeteners and their effects on microbial communities in sequencing batch reactors. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3399, 21 dez. 2018.

LI, X. et al. Metagenome-Assembled Genome Sequence of *Sulfuricurvum* sp. Strain IAE1, Isolated from a 4-Chlorophenol-Degrading Consortium. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 31, p. 18–19, 1 ago. 2019.

LIANG, X. et al. Anaerobic conversion of chlorobenzene and benzene to CH₄ and CO₂ in bioaugmented microcosms. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 5, p. 2378–2385, 5 mar. 2013.

LIN, A. Y.-C. et al. Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products in

Taiwan's aquatic environment. **Desalination and Water Treatment**, v. 32, n. 1–3, p. 57–64, ago. 2011.

LIU, J. et al. Microbial community structure and function in sediments from e-waste contaminated rivers at Guiyu area of China. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 171–179, abr. 2018.

LIU, Y. et al. Characterization of the anaerobic propionate- degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 545–556, 1999.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 171–189, 26 mar. 2008.

LÖFFLER, C. et al. Occurrence, genes and expression of the W/Se-containing class II benzoyl-coenzyme A reductases in anaerobic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 696–709, mar. 2011.

LONAPPAN, L. et al. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. **Environment International**, v. 96, p. 127–138, nov. 2016.

LOOS, R. et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water Research**, v. 44, n. 14, p. 4115–4126, jul. 2010.

LOOS, R. et al. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. **Water Research**, v. 47, n. 17, p. 6475–6487, nov. 2013.

LUBARSKY, H. V. et al. Impairment of the Bacterial Biofilm Stability by Triclosan. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e31183, 16 abr. 2012.

LUEDERS, T. The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 1, p. fiw220, jan. 2017.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, mar. 2014.

MACEDO, T. Z. et al. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 10, p. 1835–1844, 19 out. 2015.

MACEDO, T. Z. et al. Influence of linear alkylbenzene sulfonate and ethanol on the degradation kinetics of domestic sewage in co-digestion with commercial laundry wastewater. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 0123456789, 7 jun. 2019.

MACEDO, T. Z. et al. The influence of upflow velocity and hydraulic retention time changes on taxonomic and functional characterization in Fluidized Bed Reactor treating commercial laundry wastewater in co-digestion with domestic sewage. **Biodegradation**, v. 21, p. 73–89, 2020.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms**. 15. ed. [s.l.: s.n.].

MAENG, S. K. et al. Organic micropollutant removal from wastewater effluent-impacted drinking water sources during bank filtration and artificial recharge. **Water Research**, v. 44, n. 14, p. 4003–4014, jul. 2010.

MAGOC, T.; SALZBERG, S. L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 2957–2963, 1 nov. 2011.

MALMBORG, J.; MAGNÉR, J. Pharmaceutical residues in sewage sludge: Effect of sanitization and anaerobic digestion. **Journal of Environmental Management**, v. 153, p. 1–10, abr. 2015.

MANNENS, G.; SLEGGERS, G.; CLAEYS, A. Purification and immobilization of acetate kinase from *Desulfovibrio vulgaris*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 8, p. 563–568, 1988.

MARTIN-DIAZ, L. et al. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 177–185, 14 set. 2009.

MARTIN RUEL, S. et al. On-site evaluation of the efficiency of conventional and advanced secondary processes for the removal of 60 organic micropollutants. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 12, p. 2970–2978, dez. 2010.

MARTINEZ GOMEZ, D. A.; BACA, S.; WALSH, E. J. Lethal and sublethal effects of

selected PPCPs on the freshwater rotifer, *Platyonus patulus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 913–922, abr. 2015.

MARUGÁN, J. et al. Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 213–214, p. 117–122, abr. 2012.

MAUS, I. et al. Complete genome sequence of the methanogenic neotype strain *Methanobacterium formicicum* MFT. **Journal of Biotechnology**, v. 192, n. Part A, p. 40–41, dez. 2014.

MCCURRY, D. L. et al. Superior Removal of Disinfection Byproduct Precursors and Pharmaceuticals from Wastewater in a Staged Anaerobic Fluidized Membrane Bioreactor Compared to Activated Sludge. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 1, n. 11, p. 459–464, 11 nov. 2014.

MCNAMARA, P. J.; KRZMARZICK, M. J. Triclosan enriches for Dehalococcoides -like Chloroflexi in anaerobic soil at environmentally relevant concentrations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 344, n. 1, p. 48–52, jul. 2013.

MCNAMARA, P. J.; LAPARA, T. M.; NOVAK, P. J. The Impacts of Triclosan on Anaerobic Community Structures, Function, and Antimicrobial Resistance. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 13, p. 7393–7400, 19 jul. 2014.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery**. 5. ed. [s.l.: s.n.].

MOLINA, M. C. et al. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. **Biodegradation**, v. 20, n. 6, p. 789–800, 26 nov. 2009.

MOLINA, M. C. et al. From Laboratory Tests to the Ecoremedial System: The Importance of Microorganisms in the Recovery of PPCPs-Disturbed Ecosystems. **Applied Sciences**, v. 10, n. 10, p. 3391, 14 maio 2020.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 803–814, jul. 2009.

MORI, K. et al. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldisericaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. no. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 59, n. 11, p. 2894–2898, 1 nov. 2009.

MOROTOMI, M.; NAGAI, F.; WATANABE, Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 62, n. 1, p. 144–149, 1 jan. 2012.

MÖSCHE, M. Anaerobic Degradability of Alcohol Ethoxylates and Related Non-Ionic Surfactants. **Biodegradation**, v. 15, n. 5, p. 327–336, out. 2004.

MÖSCHE, M.; MEYER, U. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic digestion: influence of exposure time. **Water Research**, v. 36, n. 13, p. 3253–3260, jul. 2002.

MOTTERAN, F. et al. Metabolic routes involved in the removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) employing linear alcohol ethoxylated and ethanol as co-substrates in enlarged scale fluidized bed reactor. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 1411–1423, nov. 2018.

MOTTERAN, F. et al. Influence of cosubstrates for linear anionic sulfonated alkylbenzene degradation and methane production in anaerobic batch reactors. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 139, p. 60–68, jul. 2020.

MOURA, A. G. L. et al. Laundry wastewater and domestic sewage pilot-scale anaerobic treatment: Microbial community resilience regarding sulfide production. **Journal of Environmental Management**, v. 251, n. May, p. 109495, dez. 2019.

MÜLLER, B. et al. Pharmaceuticals as indicators of sewage-influenced groundwater. **Hydrogeology Journal**, v. 20, n. 6, p. 1117–1129, 26 set. 2012.

MÜLLER, V.; SPANHEIMER, R.; SANTOS, H. Stress response by solute accumulation in archaea. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 729–736, dez. 2005.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Mass balance of anionic surfactants through up-flow anaerobic sludge blanket based sewage treatment plants. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 87, n. 4, p. 254–260, jul. 2009.

NAGPAL, S. et al. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: An experimental and modeling study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 5, p. 533–543, 5 dez. 2000.

NAIDOO, V. et al. Veterinary diclofenac threatens Africa's endangered vulture species. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 205–208, abr. 2009.

NASSEF, M. et al. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 80, n. 9, p. 1095–1100, ago. 2010.

NESBØ, C. L. et al. *Mesotoga prima* gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the Thermotogales. **Extremophiles**, v. 16, n. 3, p. 387–393, 13 maio 2012.

NGUYEN, P. D.; VAN GINKEL, C. G.; PLUGGE, C. M. Anaerobic degradation of long-chain alkylamines by a denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 136–142, out. 2008.

NIKPAY, M.; LAZIK, D.; KREBS, P. Permeability changes by surfactant solution: an experimental study to represent wastewater loss from sewers to saturated soil. **Environmental Earth Sciences**, v. 73, n. 12, p. 8443–8450, jun. 2015.

NISHIYAMA, T. et al. *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1901–1907, 2009.

NKAMGA, V. D.; DRANCOURT, M. *Methanomassiliicoccus*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 1–7.

NÚÑEZ, L. A.; MARTÍNEZ, B. Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 99–106, 1999.

OKADA, D. Y. et al. **Degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio**

de manta de lodo e fluxo ascendente. VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM.

Anais...São Carlos: 2009Disponível em: <<http://www.ambiente-augm.ufscar.br/uploads/A2-042.pdf>>

OKADA, D. Y. et al. Influence of co-substrates in the anaerobic degradation of an anionic surfactant. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 3, p. 499–506, set. 2013a.

OKADA, D. Y. et al. Influence of volatile fatty acid concentration stability on anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 169–172, out. 2013b.

OLIVEIRA, T. S. et al. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. **Science of The Total Environment**, v. 518–519, p. 459–478, jun. 2015.

OUYANG, E. et al. Performance and dynamic characteristics of microbial communities in multi-stage anaerobic reactors treating gibberellin wastewater. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 3, p. 318–325, mar. 2019.

OYA, M.; HISANO, N. Decreases in surface activities and aquatic toxicities of linear alkylbenzene sulfonate and alcohol ethoxylates during biodegradation. **Journal of oleo science**, v. 59, n. 1, p. 31–39, 2010.

PARSHINA, S. N.; STAMS, A. J. M. Soehngenia. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–3.

PATEL, M. et al. Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 6, p. 3510–3673, 27 mar. 2019.

PENNINGTON, M. J. et al. Pharmaceuticals and personal care products alter the holobiome and development of a medically important mosquito. **Environmental Pollution**, v. 203, p. 199–207, ago. 2015.

PENTEADO, E. D. et al. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137–6145, maio 2013.

PETERS, F. et al. Cyclohexa-1,5-Diene-1-Carbonyl-Coenzyme A (CoA) Hydratases of *Geobacter metallireducens* and *Syntrophus aciditrophicus*: Evidence for a Common Benzoyl-CoA Degradation Pathway in Facultative and Strict Anaerobes. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 1055–1060, 1 fev. 2007.

PETERSEN, K.; HEIAAS, H. H.; TOLLEFSEN, K. E. Combined effects of pharmaceuticals, personal care products, biocides and organic contaminants on the growth of *Skeletonema pseudocostatum*. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 45–54, maio 2014.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3–27, abr. 2015.

PETROVIC, M. et al. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 367, n. 1904, p. 3979–4003, 13 out. 2009.

PLUGGE, C. M. et al. Complete genome sequence of *Syntrophobacter fumaroxidans* strain (MPOBT). **Standards in Genomic Sciences**, v. 7, n. 1, p. 91–106, 26 set. 2012.

POSTIGO, C. et al. Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry detection. **Journal of Hydrology**, v. 383, n. 1–2, p. 83–92, mar. 2010.

PRUD'HOMME, S. M. et al. Multiscale Approach to Deciphering the Molecular Mechanisms Involved in the Direct and Intergenerational Effect of Ibuprofen on Mosquito *Aedes aegypti*. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 14, p. 7937–7950, 17 jul. 2018.

PRUDEN, A. M. Y. et al. Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants : Studies in Northern Colorado †. **Environ. Sci. Technol**, v. 40, n. 23, p. 7445–7450, 2006.

PULLIAM HOLOMAN, T. R. et al. Characterization of a Defined 2,3,5,6-Tetrachlorobiphenyl-ortho-Dechlorinating Microbial Community by Comparative Sequence Analysis of Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3359–3367, 1998.

QIU, Y.-L. et al. 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, 1 abr. 2008.

QIU, Y.-L. et al. 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, n. Pt_6, p. 2137–2145, 1 jun. 2014.

QUANDT, E. M. et al. Draft Genome Sequence of the Bacterium Pseudomonas putida CBB5, Which Can Utilize Caffeine as a Sole Carbon and Nitrogen Source. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, 25 jun. 2015.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.

QUINN, B. et al. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. **Chemosphere**, v. 84, n. 5, p. 657–663, jul. 2011.

QUINTANA, J.; WEISS, S.; REEMTSMA, T. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. **Water Research**, v. 39, n. 12, p. 2654–2664, jul. 2005.

RAINSFORD, K. D. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 6, p. 275–342, 21 dez. 2009.

RAUT, S. A.; ANGUS, R. A. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 6, p. n/a-n/a, 2010.

REYES-CONTRERAS, C.; LEIVA, A. M.; VIDAL, G. Evaluation of triclosan toxic effects on the methanogenic activity. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 61–66, maio 2019.

RHEE, J.-S. et al. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AChE) activity and on the expression of AChE gene in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 158, n. 4, p. 216–224, nov. 2013.

RICART, M. et al. Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 4, p. 346–353, nov. 2010.

RIPLEY, A. L. E. et al. Alkalimetric Improved for anaerobic digestion wastes monitoring of. v. 58, n. 5, p. 406–411, 2014.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion wastes of high-strength wastes. **Water Environment Federation**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.

RIVA, C.; CRISTONI, S.; BINELLI, A. Effects of triclosan in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: A proteomic investigation. **Aquatic Toxicology**, v. 118–119, p. 62–71, ago. 2012.

ROALKVAM, I. et al. Physiological and genomic characterization of *Arcobacter anaerophilus* IR-1 reveals new metabolic features in Epsilonproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–12, 16 set. 2015.

ROBERTS, P. H.; THOMAS, K. V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. **Science of The Total Environment**, v. 356, n. 1–3, p. 143–153, 1 mar. 2006.

ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Research**, v. 44, p. 578–588, 2010.

ROSI-MARSHALL, E. J. et al. Pharmaceuticals suppress algal growth and microbial respiration and alter bacterial communities in stream biofilms. **Ecological Applications**, v. 23, n. 3, p. 583–593, abr. 2013.

ROSSO, G. E.; MUDAY, J. A.; CURRAN, J. F. Tools for Metagenomic Analysis at Wastewater Treatment Plants: Application to a Foaming Episode. **Proceedings of the Water**

Environment Federation, v. 2018, n. 16, p. 1398–1417, 1 jan. 2018.

SÁNCHEZ, E. et al. Effect of organic loading rate on the stability, operational parameters and performance of a secondary upflow anaerobic sludge bed reactor treating piggery waste.

Bioresource Technology, v. 96, n. 3, p. 335–344, fev. 2005.

SANFORD, R. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. Characterization and Description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an Aryl-Halorespiring Facultative Anaerobic Myxobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 893–900, 2002.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals.

Science of The Total Environment, v. 461–462, p. 302–316, set. 2013.

SCHNELL, S.; SCHINK, B. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. **Archives of Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 183–190, 1 jan. 1991.

SCHOMBURG, I. et al. The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system. **Journal of Biotechnology**, v. 261, n. February, p. 194–206, nov. 2017.

SCHUCHMANN, K.; MÜLLER, V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 809–821, 10 dez. 2014.

SCHURE, A. Y.; DINARDO, J. A. **Cardiac Physiology and Pharmacology**. Sixth Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

SHI, J. et al. Enhanced biodegradation of coal gasification wastewater with anaerobic biofilm on polyurethane (PU), powdered activated carbon (PAC), and biochar. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121487, out. 2019.

SHIVAJI, S. et al. Vertical distribution of bacteria in a lake sediment from Antarctica by culture-independent and culture-dependent approaches. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 191–203, fev. 2011.

SIM, W.-J. et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from

households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**, v. 82, n. 2, p. 179–186, jan. 2011.

SIMON, J.; KRONECK, P. M. H. Microbial Sulfite Respiration. In: [s.l.: s.n.]. p. 45–117.

SINGER, H. et al. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water.

Environmental Pollution, v. 158, n. 10, p. 3054–3064, out. 2010.

SMIDT, H.; DE VOS, W. M. Anaerobic Microbial Dehalogenation. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 43–73, out. 2004.

SNIS. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto - 2014**. [s.l.: s.n.].

SOBIERAJ, M.; BOONE, D. R. Smithella. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–3.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 416A-427A, set. 1983a.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 416A-427A, set. 1983b.

SPONGBERG, A. L. et al. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6709–6717, dez. 2011.

STAMATIS, N.; HELA, D.; KONSTANTINOU, I. Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 829–835, mar. 2010.

STAMATIS, N. K.; KONSTANTINOU, I. K. Occurrence and removal of emerging pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage treatment plant in Western Greece. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 9, p. 800–813, 2 set. 2013.

STAMS, A. J. M. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, n. 1–3, p. 271–294, 1994.

STAMS, A. J. M. et al. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 371–382, mar. 2006.

STAMS, A. J. M. et al. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 2, p. 352–362, 1 jul. 2012.

STANTSCHIEFF, R. et al. Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5719–5735, 18 jun. 2014.

STASINAKIS, A. S. et al. Occurrence of endocrine disruptors and selected pharmaceuticals in Aisonas River (Greece) and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 5, p. 1574–1583, 25 jun. 2012.

STASINAKIS, A. S. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 432–440, out. 2012.

STASINAKIS, A. S. et al. Contribution of primary and secondary treatment on the removal of benzothiazoles, benzotriazoles, endocrine disruptors, pharmaceuticals and perfluorinated compounds in a sewage treatment plant. **Science of The Total Environment**, v. 463–464, p. 1067–1075, out. 2013.

STEPIEN, D. K. et al. Behavior of organophosphates and hydrophilic ethers during bank filtration and their potential application as organic tracers. A field study from the Oderbruch, Germany. **Science of The Total Environment**, v. 458–460, p. 150–159, ago. 2013.

STEVENS-GARMON, J. et al. Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids. **Water Research**, v. 45, n. 11, p. 3417–3426, maio 2011.

SU, X.-L. et al. *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp.

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, v. 64, n. Pt 9, p. 2986–2991, 1 set. 2014.

SUI, Q. et al. Seasonal Variation in the Occurrence and Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Different Biological Wastewater Treatment Processes.

Environmental Science & Technology, v. 45, n. 8, p. 3341–3348, 15 abr. 2011.

SUN, Q. et al. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in a wastewater treatment plant in Xiamen, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 277, n. 30, p. 69–75, 2014.

SYMSARIS, E. C. et al. Effects of triclosan , diclofenac , and nonylphenol on mesophilic and thermophilic methanogenic activity and on the methanogenic communities. **Journal of Hazardous Materials**, v. 291, p. 45–51, 2015.

SZABÓ, R. K. et al. Phototransformation of ibuprofen and ketoprofen in aqueous solutions. **Chemosphere**, v. 84, n. 11, p. 1658–1663, set. 2011.

TANG, T. T. et al. Effect of straw on microbial community composition and degradation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge digester. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 12, p. 7973–7986, 13 dez. 2019.

TEIJON, G. et al. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 17, p. 3584–3595, 1 ago. 2010.

THOMAS, F. et al. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. MAY, p. 1–16, 2011.

TOHIDI, F.; CAI, Z. Fate and mass balance of triclosan and its degradation products: Comparison of three different types of wastewater treatments and aerobic/anaerobic sludge digestion. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 329–340, fev. 2017.

TORTELLA, G. et al. Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health? **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 165–172, 3 abr. 2015.

TRABLY, E.; PATUREAU, D.; DELGENES, J. P. Enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons removal during anaerobic treatment of urban sludge. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 53–60, 2003.

TRAVERSO-SOTO, J. M. et al. Distribution of anionic and nonionic surfactants in a sewage-impacted Mediterranean coastal lagoon: Inputs and seasonal variations. **Science of The Total**

Environment, v. 503–504, p. 87–96, jan. 2015.

UNITED NATIONS. **Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development**, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b20466-7>>

USMAN, M.; FAROOQ, M.; HANNA, K. Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. **Science of The Total Environment**, v. 745, p. 141053, nov. 2020.

VAN DER AA, N. G. F. M. et al. Demographic projections of future pharmaceutical consumption in the Netherlands. **Water Science and Technology**, v. 63, n. 4, p. 825–831, 2011.

VELDHOEN, N. et al. Effects of Acute Exposure to the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Ibuprofen on the Developing North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Tadpole. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 17, p. 10439–10447, 2 set. 2014.

VELEVSKI, M. et al. Population decline and range contraction of the Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* in the Balkan Peninsula. **Bird Conservation International**, v. 25, n. 4, p. 440–450, 5 dez. 2015.

VERLICCHI, P. et al. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 430, p. 109–118, jul. 2012.

VILLAR-NAVARRO, E. et al. Removal of pharmaceuticals in urban wastewater: High rate algae pond (HRAP) based technologies as an alternative to activated sludge based processes. **Water Research**, v. 139, p. 19–29, ago. 2018.

VOGEL, T. M.; CRIDDLE, C. S.; MCCARTY, P. L. ES Critical Reviews: Transformations of halogenated aliphatic compounds. **Environmental Science & Technology**, v. 21, n. 8, p. 722–736, ago. 1987.

VON SPERLING, M. **Urban wastewater treatment in Brazil**. [s.l.: s.n.].

VULLIET, E.; CREN-OLIVÉ, C.; GRENIER-LOUSTALOT, M.-F. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. **Environmental**

Chemistry Letters, v. 9, n. 1, p. 103–114, 28 mar. 2011.

WAGENER, S.; SCHINK, B. Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate-forming bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 2, p. 561–565, 1988.

WAHLUND, T. M.; MADIGAN, M. T. Nitrogen fixation by the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 2, p. 474–478, jan. 1993.

WANG, C. et al. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Research**, v. 45, n. 4, p. 1818–1828, fev. 2011.

WANG, J.; WANG, S. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 182, p. 620–640, nov. 2016.

WANG, L. et al. Anoxic biodegradation of triclosan and the removal of its antimicrobial effect in microbial fuel cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 669–678, fev. 2018.

WANG, Q. et al. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 15 ago. 2007.

WANG, S.; HOU, X.; SU, H. Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1149, 25 dez. 2017.

WEXLER, M. et al. A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1917–1926, 16 ago. 2005.

WHITE, J. R.; NAGARAJAN, N.; POP, M. Statistical Methods for Detecting Differentially Abundant Features in Clinical Metagenomic Samples. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 4, p. e1000352, 10 abr. 2009.

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The Methanogenic Bacteria. In: **The Prokaryotes**. [s.l.] Springer New York, 2006. p. 165–207.

WINZER, K.; LORENZ, K.; DURRE, P. Acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum*: a highly specific enzyme that is actively transcribed during acidogenesis and solventogenesis. **Microbiology**, v. 143, n. 10, p. 3279–3286, 1 out. 1997.

WISCHGOLL, S. et al. Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1238–1252, dez. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The selection and use of essential medicines**. [s.l.: s.n.]. v. 7

WU, W.-M. et al. Perturbation of syntrophic isobutyrate and butyrate degradation with formate and hydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 3, p. 404–411, 26 mar. 2000.

XIE, H. et al. Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 659, p. 230–239, abr. 2019.

XIE, Z. et al. An anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for landfill leachate treatment: Performance and microbial community identification. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 29–39, jun. 2014.

XU, M. et al. Bar-Coded Pyrosequencing Reveals the Responses of PBDE-Degrading Microbial Communities to Electron Donor Amendments. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30439, 25 jan. 2012.

XU, Y. et al. Advances in technologies for pharmaceuticals and personal care products removal. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, n. 24, p. 12001–12014, 2017.

YAMADA, T. et al. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2299–2306, 1 out. 2007.

- YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y. Longilinea. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 1–3.
- YAMAMOTO, K. et al. Complete Genome Sequence of Methanolinea tarda NOBI-1T, a Hydrogenotrophic Methanogen Isolated from Methanogenic Digester Sludge. **Genome Announcements**, v. 2, n. 5, p. 1–2, 4 set. 2014.
- YANG, S. et al. Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 153–159, jun. 2016.
- YAZDANKHAH, S. P. et al. Triclosan and Antimicrobial Resistance in Bacteria: An Overview. **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 2, p. 83–90, jun. 2006.
- YOUSSEF, N. et al. Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rRNA Gene-Based Environmental Surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5227–5236, 15 ago. 2009.
- YU, L. et al. Purification and Characterization of Homo- and Hetero-Dimeric Acetate Kinases from the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio vulgaris*. **Journal of Biochemistry**, v. 129, n. 3, p. 411–421, 1 mar. 2001.
- YUAN, C. L. et al. Study on characteristics and harm of surfactants. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 7, p. 2233–2237, 2014.
- ZENOBIO, J. E. et al. Effects of triclocarban, N,N -diethyl-meta-toluamide, and a mixture of pharmaceuticals and personal care products on fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 910–919, abr. 2014.
- ZHANG, Y. et al. Evaluation of the Toxic Effects of Municipal Wastewater Effluent on Mice Using Omic Approaches. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 16, p. 9470–9477, 20 ago. 2013.
- ZHAO, J.-L. et al. Evaluation of triclosan and triclocarban at river basin scale using monitoring and modeling tools: Implications for controlling of urban domestic sewage discharge. **Water Research**, v. 47, n. 1, p. 395–405, jan. 2013.
- ZHAO, J. et al. Correlation between microbial diversity and toxicity of sludge treating

synthetic wastewater containing 4-chlorophenol in sequencing batch reactors. **Chemosphere**, v. 153, p. 138–145, jun. 2016.

ZHAXYBAYEVA, O. et al. Genome Sequence of the Mesophilic Thermotogales Bacterium *Mesotoga prima* MesG1.Ag.4.2 Reveals the Largest Thermotogales Genome To Date.

Genome Biology and Evolution, v. 4, n. 8, p. 812–820, 2012.

ZWIENER, C. et al. Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. **Analytical and Bioanalytical**

Chemistry, v. 372, n. 4, p. 569–575, 6 fev. 2002.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, abr. 1990.

APÊNDICE

Protocolo para operação de reator em escala aumentada na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São Carlos-SP (Brasil).

Equipamentos de proteção individual (EPI) necessários:

- Jaleco;
- Roupa impermeável (exemplo: capa de chuva);
- Luvas do tipo PVC;
- Luvas de borracha nitrílica;
- Botas de borracha do tipo antiderrapante;
- Máscara semifacial do tipo PFF-2;
- Máscara com visor facial protetor;
- Óculos de proteção.

Além dos EPI, faz-se necessário a utilização de agentes químicos para descontaminação pessoal e das ferramentas utilizadas, bem como a vacinação apropriada.

Passos para esvaziar a caixa de alimentação:

- 1) Desligar a bomba de alimentação (Figura A1);

Figura A1: Bomba de diafragma para alimentação do reator.



Fonte: Autora.

- 2) Fechar válvula 1 (Figura A2);
- 3) Abrir válvulas 2 e 5 (Figura A2);
- 4) Esperar a caixa esvaziar completamente;
- 5) Lavar a caixa com água para retirada do lodo e demais sólidos;
- 6) Esperar a caixa esvaziar completamente;
- 7) Fechar válvulas 2 e 5 (Figura A2);

Figura A2: Caixa de alimentação do reator.



Fonte: Autora.

Passos para encher a caixa de alimentação com esgoto pós-tratamento preliminar da ETE:

- 8) Certifique-se de que as válvulas 2, 4 e 5 estão fechadas (Figura A2);
- 9) Abrir válvulas 3 (Figura A2);
- 10) Ligar a bomba do preliminar (Figura A3);

Figura A3: Tomada da bomba do preliminar.



Fonte: Autora.

11) Observar se está jorrando esgoto (Figura A4);

Em caso positivo, prosseguir com os passos 12 ao 18.

Em caso negativo, prosseguir com os passos 19 ao 30.

Figura A4: Esgoto jorrando na caixa de alimentação do reator.



Fonte: Autora.

- 12) Esperar a caixa encher;
- 13) Desligar a bomba do preliminar (Figura A3);
- 14) Fechar válvula 3 (Figura A2);
- 15) Abrir válvula 1 (Figura A2);
- 16) Fechar a caixa com a tampa (Figura A2);
- 17) Ligar bomba de alimentação do reator (Figura A1);
- 18) Aferir vazão de alimentação conforme o tempo de detenção hidráulico (TDH) determinado.

Passos para encher a caixa de alimentação com esgoto pós-tratamento preliminar da ETE quando a bomba não funcionar:

- 19) Conectar a mangueira na torneira que fica embaixo do tratamento preliminar;
- 20) Levar a mangueira até o tratamento preliminar onde a bomba está instalada;
- 21) Abrir a mangueira;
- 22) Abrir válvula 6 (Figura A5);
- 23) Imediatamente, colocar a mangueira no conector 7 (Figura A5) tapando com a mão para que não entre ar na tubulação e nem na bomba;
- 24) Esperar o cano da válvula 6 ficar completo de água (em torno de 2 a 3 minutos; Figura A5);
- 25) Fechar válvula 6 o mais rápido que puder e com o máximo de cuidado possível para não entrar ar (Figura A5);
- 26) Fechar mangueira;
- 27) Verificar se está jogando esgoto na caixa de alimentação do reator (Figura A4);
- 28) Em caso positivo, prosseguir com os passos 12 ao 18;
- 29) Em caso negativo, repetir os passos 19 ao 28 (tentar abrir e fechar a válvula 4 da Figura 2 para ajudar a saída de ar);
- 30) Se após realizar 3 vezes os passos 19 ao 28 e mesmo assim a bomba do preliminar não funcionar, realizar o procedimento para limpeza do pé de crivo da bomba (passos 31 ao 36).

Figura A5: Bomba centrífuga instalada no tratamento preliminar da ETE de São Carlos – SP.



Fonte: Autora.

Passos para limpeza do pé de crivo:

- 31) Desligar a bomba do preliminar (Figura A3);
- 32) Retirar o pé de crivo da bomba;

Figura A6: Retirando o pé de crivo da bomba instalada no tratamento preliminar da ETE.



Fonte: Autora.

33) Com o auxílio de uma pinça, retirar os sólidos grudados (Figura A7);

34) Larvar com água (Figura A7);

Figura A7: Limpeza do pé de crivo da bomba instalada no tratamento preliminar da ETE.



Fonte: Autora.

- 35) Encaixar de volta o pé de crivo na bomba (Figura A6);
- 36) Prosseguir com os passos 19 ao 28.

ANEXO

Informações adicionais das análises de biologia molecular, bioinformática e bioestatística

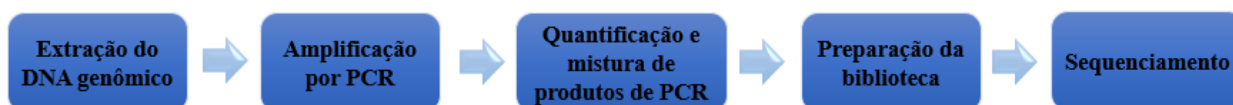
A sequência do RNA ribossômico 16S (RNAr) é composta por nove regiões hipervariáveis intercaladas com regiões conservadas. O gene 16S bacteriano contém nove regiões hipervariáveis (V1-V9), variando de cerca de 30 a 100 pares de bases, envolvidas na estrutura secundária da pequena subunidade ribossômica. O grau de conservação varia amplamente entre regiões hipervariáveis, com regiões mais conservadas correlacionadas com taxonomia de categoria mais alta e regiões menos conservadas com classificações inferiores, como gênero e espécie. Para a classificação taxonômica, é suficiente sequenciar regiões hipervariáveis individuais em vez de todo o gene. Além disso, o gene 16S contém sequências altamente conservadas entre regiões hipervariáveis, permitindo o design de primers universais. Com o desenvolvimento de plataformas de sequenciamento de alto rendimento, a variação de sequência no gene 16S é amplamente utilizada para caracterizar diversas comunidades microbianas (Youssef et al., 2009; Caporaso et al., 2011; Hess et al., 2011).

Com base em algoritmos de par-extremidade, o sequenciamento de amplicons é conduzido na plataforma Illumina.

I. Preparação e sequenciamento

A qualidade dos dados é influenciada por cada etapa de preparação da amostra. Ou seja, desde as amostras de DNA brutas, até o teste de amostra, PCR, preparação e sequenciamento de bibliotecas, influenciam nos resultados da análise. Portanto, para manter a confiabilidade dos dados, o controle de qualidade (CQ) é realizado em cada etapa do procedimento. O procedimento utilizado para preparo e sequenciamento das amostras genômicas está descrito no fluxograma da Figura A8.

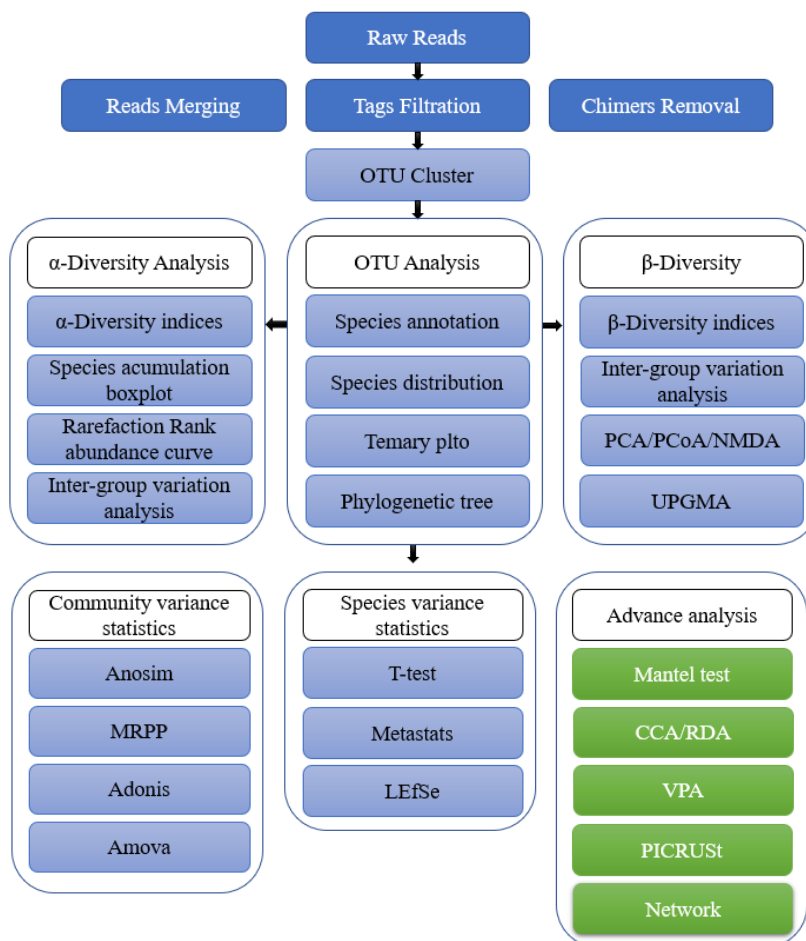
Figura A8: Procedimento utilizado para preparo e sequenciamento das amostras genômicas.



II. Procedimentos de análise de dados

Para a veracidade da análise de dados de sequenciamento, os dados brutos devem ser mesclados e filtrados para obter dados limpos. Os dados efetivos gerados podem ser utilizados para fazer anotações de cluster, e de espécies, para cada respectiva sequência de cada OTU (Unidades Taxonômicas Operacionais). Assim, a distribuição relativa, uniformidade e abundância das espécies podem ser analisadas por meio da diversidade de Alpha, de Beta e de venn. A colheita de OTU e a construção das atribuições taxonômicas de árvores filogenéticas, por meio de análises estatísticas, podem explicar as diferenças de construção da comunidade entre amostras, ou entre grupos, via PCoA, PCA e NMDS. Métodos estatísticos como teste T, MetaStat, LEfSe, Anosim e MRPP podem testar a significância da composição da comunidade e as diferenças de estrutura entre os grupos. Além disso, o resultado da análise combina CCA/RDA para explorar os principais fatores ambientais. O procedimento para análise de dados está descrito no fluxograma da Figura A9.

Figura A9: Procedimento para análise dos dados.



Para avaliar diferenças de espécies é utilizado Metastats. Por meio de tal teste estatístico, obtém-se e seleciona diferentes espécies óbvias entre grupos de várias categorias taxonômicas (Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie). Assim, é possível realizar análises adicionais ou escolher a análise LefSE para descobrir biomarcadores estatisticamente significativos entre os grupos.

As análises Anosim e MRPP podem ser usadas para determinar se a estrutura da comunidade difere significativamente entre os grupos. Além disso, pode-se comparar as diferenças tanto entre os grupos, como dentro dos grupos.

A análise NMDS pode ser utilizada como método suplementar caso tenha sido obtido resultados inesperados de PCA e PCoA. Isto porquê NMDS é baseado em modelo não linear. PCA e PCoA, por outro lado, são baseados em modelo linear. Assim, NMDS pode oferecer melhor explicação/abordagem da estrutura não linear em conjuntos de dados ecológicos.

Para uma análise exploratória, se houver vários fatores ambientais envolvidos, pode ser selecionado a análise CCA ou RDA para extrair gradientes ambientais de conjuntos de dados ecológicos e encontrar fatores determinantes ambientais que influenciam o desenvolvimento de certas comunidades microbianas.

III. Processamento dos dados de sequenciados

Por meio dos Amplicons, foi realizado o sequenciamento via plataforma Illumina-Miseq para gerar leituras brutas das extremidade emparelhadas de 250bp (PE em bruto). Em seguida, foi montada e pré-tratada as tags limpas. As sequências quiméricas em Clean Tags foram detectadas e removidas para obter as tags efetivas. A saída de dados é mostrada na Tabela A1.

| Sample name | Raw PE (#) | Raw Tags (#) | Clean Tags (#) | Effective Tags (#) | Base (nt) |
|--------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|
| DE | 62,996 | 61,896 | 60,922 | 58,496 | 14,812,816 |
| IE | 69,258 | 66,976 | 65,849 | 63,437 | 16,085,552 |
| P3 | 101,144 | 87,813 | 85,689 | 82,801 | 34,789,019 |
| TE | 101,035 | 87,530 | 85,746 | 83,897 | 34,666,983 |
| Fase I | 80,656 | 47,079 | 41,756 | 37,069 | 15,067,584 |
| Fase II | 88,997 | 53,047 | 46,055 | 38,360 | 15,587,924 |
| Fase III | 90,683 | 52,888 | 46,126 | 38,560 | 15,835,297 |

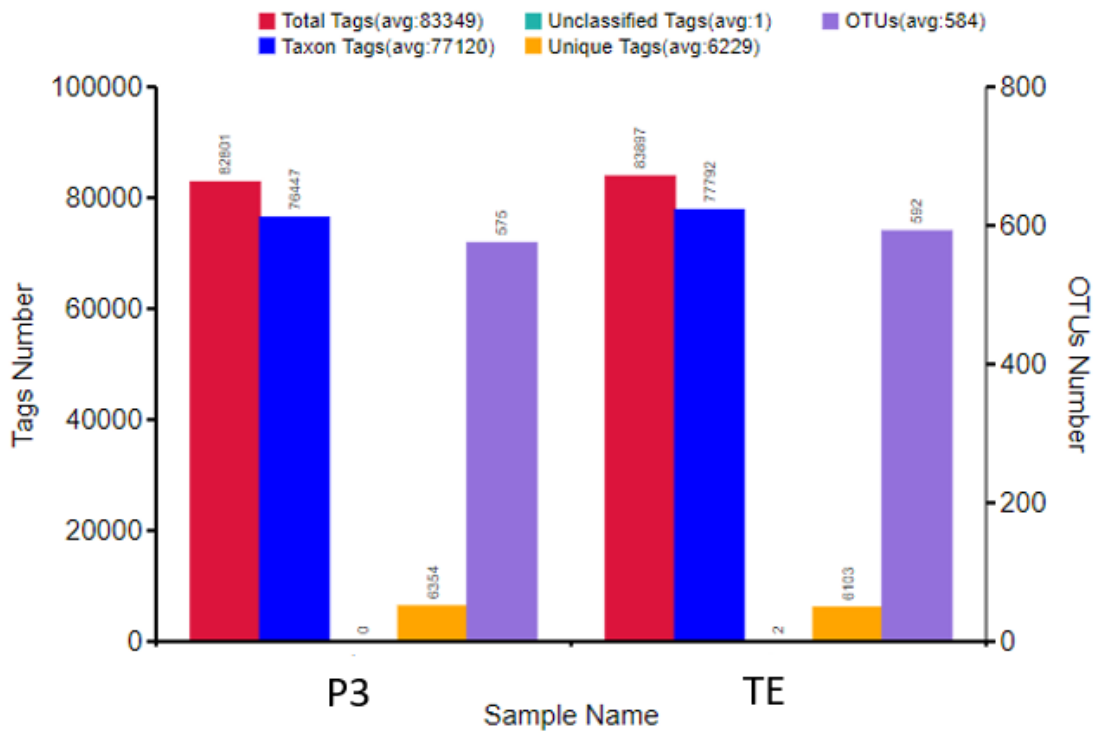
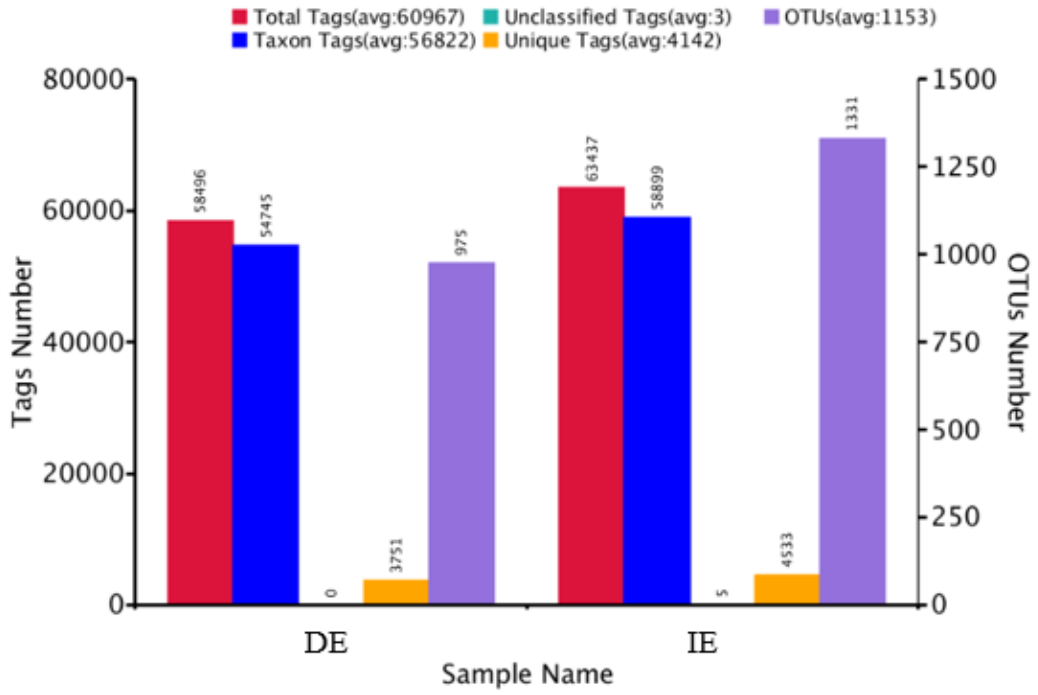
| Sample name | Avglen (ny) | Q20 | Q30 | GC (%) | Effective (%) |
|--------------------|--------------------|------------|------------|---------------|----------------------|
| DE | 253 | 99.13 | 97.28 | 55.14 | 92,86 |
| IE | 254 | 99.10 | 97.23 | 54.51 | 91,60 |
| P3 | 420 | 97.15 | 91.77 | 53.04 | 81,86 |
| TE | 413 | 97.15 | 91.76 | 53.30 | 83,04 |
| Fase I | 406 | 96.04 | 89.81 | 54.38 | 45.96 |
| Fase II | 406 | 96.05 | 89.72 | 54.84 | 43.10 |
| Fase III | 411 | 95.96 | 89.47 | 54.85 | 42.52 |

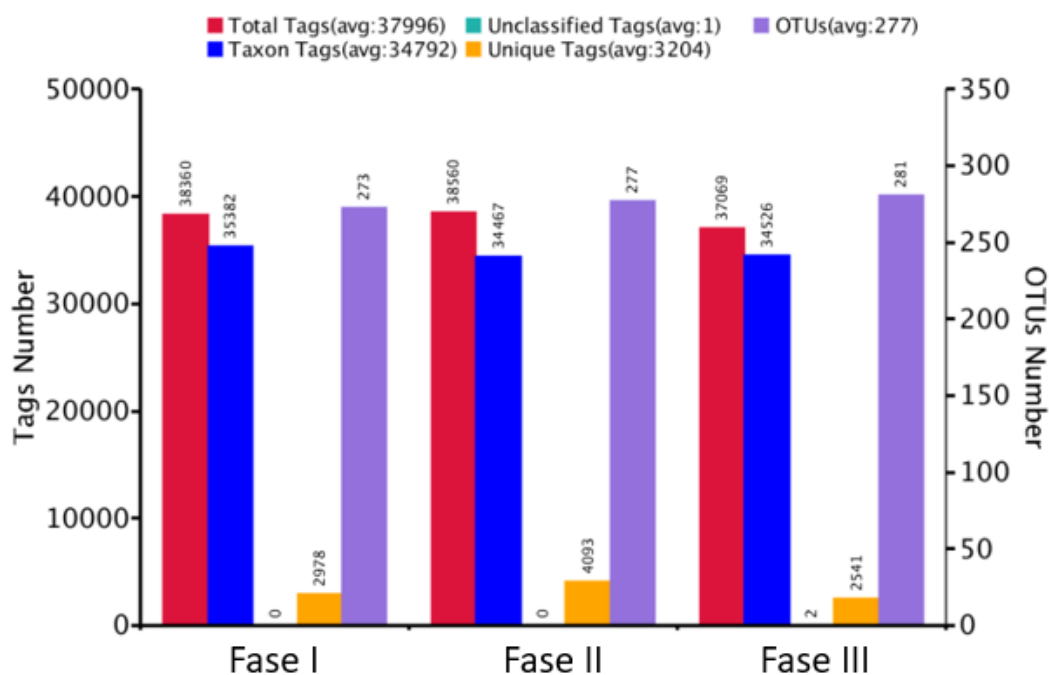
IV. Análise de OTU e anotação de espécies: identificação e anotação de OTU e análise estatística da anotação

Para analisar a diversidade de espécies em cada amostra, todos os Tags Efetivos foram agrupados por 97% de similaridade de sequência de DNA em OTUs.

Durante a construção das OTUs, foram coletadas informações básicas de diferentes amostras, como dados de Tags efetivos, dados de tags de baixa frequência e dados de anotação de Tags. O conjunto de dados estatísticos é mostrado como se segue na Figura A10.

Figura A10: Análise estatística do número de tags e OTUs de cada amostra.





Notas (da esquerda para a direita): o eixo Y1 intitulado "Número de tags" significa o número de tags; "Total de tags" (barras vermelhas) significa o número de tags efetivas; "Etiquetas de táxon" (barras azuis) significa o número de etiquetas anotadas; "Tags não classificadas" (barras verdes) significa o número de tags não anotadas; "Tags exclusivas" (barras laranja) significa o número de tags com uma frequência de 1 e ocorre apenas em uma amostra. O eixo Y2 intitulado "Números de OTUs" significa o número de OTUs exibidos como "OTUs" (barras roxas) na imagem acima para identificar o número de OTUs em diferentes amostras.

V. Extração do DNA do genoma

O DNA total do genoma das amostras foi extraído pelo método CTAB/SDS. A concentração e pureza do DNA foram monitoradas em géis de agarose a 1%. De acordo com a concentração, o DNA foi diluído para 1 ng mL^{-1} usando água estéril.

VI. Geração de Amplicon

O gene 16S rRNA foi amplificado usando primer específico (16S V4: 515F-806R). Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

VII. Quantificação e qualificação de produtos PCR

Foi misturado o mesmo volume de tampão de carga 1X (verde SYB contido) com produtos de PCR. A eletroforese foi conduzida em gel de agarose a 2% para detecção e as amostras com faixa entre 400-450 pb foram escolhidas.

VIII. Mistura dos Produtos de PCR e Purificação

Os produtos de PCR foram misturados em proporções de equidensidade. Em seguida, os produtos de PCR de mistura foram purificados com o Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha). As bibliotecas geradas com o NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit para Illumina e quantificadas via Qubit e Q-PCR foram analisadas pela plataforma Illumina.

IX. Análise de bioinformática: Processamento dos dados de sequenciados

As leituras de extremidade emparelhada foram atribuídas às amostras com base em seu código exclusivo e truncadas cortando o código e sequência do primer. As leituras de extremidade pareada foram mescladas usando o FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (MAGOC; SALZBERG, 2011). O FLASH foi projetado para mesclar leituras de extremidade pareada quando pelo menos algumas das leituras se sobrepõem à leitura gerada a partir da extremidade oposta do mesmo fragmento de DNA. As sequências de junção são chamadas de tags brutas. A filtragem de qualidade nas tags brutas foi realizada sob condições específicas de filtragem para obter as tags limpas de alta qualidade (BOKULICH et al., 2013) de acordo com o Qiime V1.7.0. As tags foram comparadas com o banco de dados de referência (banco de dados Gold, http://drive5.com/uchime/uchime_download.html) usando o algoritmo UCHIME (algoritmo UCHIME, http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) (Edgar et al., 2011) para detectar sequências quiméricas (<https://drive5.com/usearch/manual/chimeras.html>). Posteriormente as sequências quiméricas foram removidas (HAAS et al., 2011) para obtenção das tags efetivas.

X. Cluster de 2 OTU e anotação de espécies

A análise das sequências foi realizada pelo software Uparse (Uparse v7.0.1001 <http://drive5.com/uparse/>) (EDGAR, 2013) usando todas as tags efetivas. Sequências com $\geq 97\%$ de similaridade foram atribuídas às mesmas OTUs. A sequência representativa de cada OTU foi rastreada para anotações adicionais. Para cada sequência representativa, o software Mothur foi executado no banco de dados SSUrRNA do SILVA Database (<http://www.arb-silva.de/>) (WANG et al., 2007) para anotação de espécies em cada categoria taxonômica (Limiar: 0,8 ~ 1). (QUAST et al., 2012) (Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero, Espécie). Para obter a relação filogenética de todas as sequências representativas das OTUs, o MUSCLE (Versão 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) foi utilizado para comparar várias sequências rapidamente. As informações de abundância das OTUs foram normalizadas usando um padrão

de número de sequência correspondente à amostra com menos sequências. Análises subsequentes da diversidade alfa e diversidade beta foram todas realizadas com base nesses dados normalizados de saída.

XI. Diversidade Alfa e Beta

A diversidade alfa é aplicada na análise da complexidade da diversidade de espécies para uma amostra através de 6 índices, incluindo espécies observadas, Chao1, Shannon, Simpson, ACE, Good Coverage. Todos esses índices em nossas amostras foram calculados com QIIME (versão 1.7.0) e exibidos com o software R (versão 2.15.3).

A análise da diversidade beta foi usada para avaliar as diferenças das amostras na complexidade das espécies; a diversidade beta nos unfrac ponderados e não ponderados foi calculada pelo software QIIME (Versão 1.7.0). A análise de cluster foi precedida pela análise de componente principal (PCA), que foi aplicada para reduzir a dimensão das variáveis originais usando o pacote FactoMineR e o pacote ggplot2 no software R (versão 2.15.3). A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada para obter coordenadas principais e visualizar dados complexos e multidimensionais. Uma matriz de distância de unfrac ponderado ou não ponderado entre as amostras obtidas anteriormente foi transformada em um novo conjunto de eixos ortogonais, pelo qual o fator de variação máximo é demonstrado pela primeira coordenada principal e o segundo máximo pela segunda coordenada principal, e assim por diante. A análise de PCoA foi exibida pelos pacotes WGCNA, stat e ggplot2 no software R (versão 2.15.3). O método de grupos de pares não ponderados com médias aritméticas (UPGMA) Clustering foi realizado como um tipo de método hierárquico de clustering para interpretar a matriz de distância usando ligação média e foi conduzido pelo software QIIME (versão 1.7.0).

A análise do LEfSe foi realizada pelo software LEfSe. Metastats foi calculado pelo software R. O valor p foi calculado pelo método de teste de permutação, enquanto o valor q foi calculado pelo método da taxa de descoberta falsa de Benjamini e Hochberg (WHITE; NAGARAJAN; POP, 2009). Anosim, MRPP e Adonis foram realizados pelo software R (pacote Vegan: função anosim, função mrpp e função adonis). A AMOVA foi calculada por mothur usando a função amova. T_test e desenho foram realizados pelo software R.