

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

LUCIANA DE MELO PIRETE

Influência do etanol e nitrato na degradação de diclofenaco e ibuprofeno em reator em batelada e contínuo de leito fluidificado: ênfase na caracterização taxonômica e de possíveis vias metabólicas

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2022

LUCIANA DE MELO PIRETE

Influência do etanol e nitrato na degradação de diclofenaco e ibuprofeno em reator em batelada e contínuo de leito fluidificado: ênfase na caracterização taxonômica e de possíveis vias metabólicas

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Hidráulica e Saneamento

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

São Carlos

2022

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

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

D278i de Melo Firete, Luciana
Influência do etanol e nitrato na degradação de
diclofenaco e ibuprofeno em reator em batelada e
contínuo de leito fluidificado: ênfase na
caracterização taxonômica e de possíveis vias
metabólicas / Luciana de Melo Firete; orientadora
Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva. São Carlos,
2022.

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,
2022.

1. Planejamento fatorial. 2. Fármacos. 3.
Desnitrificação. 4. Esgoto sanitário. 5. Micropoluentes
emergentes. 6. IAS. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **LUCIANA DE MELO PIRETE**.

Título da tese: "Influência do etanol e nitrato na degradação de diclofenaco e ibuprofeno em reator em batelada e contínuo de leito fluidificado: ênfase na caracterização taxonômica e de possíveis vias metabólicas".

Data da defesa: 24/03/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

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

Aprovada

Prof. Dra. **Mércia Regina Domingues Moretto**
(Universidade Federal do ABC/UFABC)

Aprovada

Prof. Dra. **Giovanna Lovato**
(Instituto Mauá de Tecnologia/IMT)

Aprovada

Prof. Dr. **Marcus Vinicius Freire Andrade**
(Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Ceará/IFCE)

Aprovada

Prof. Dr. **Gunther Brucha**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Aprovada

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

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

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

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Marli e Sérgio, ao meu irmão Marcelo e ao Bruno César, com amor e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo seu infinito amor e misericórdia, por sempre estar presente, me guardando, me fortalecendo e me abençoando. Junto à Nossa Senhora que sempre passou na frente, conduzindo e abrindo os caminhos do doutorado, sobretudo pela Santíssima intercessão.

À professora Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche, pela oportunidade, dedicação e orientação. Ao professor Dr. Edson Luiz Silva pelas sugestões de operação do reator de leito fluidificado, além de auxílio na confecção do planejamento experimental.

Ao professor Dr. Pedro Sergio Fadini e ao técnico em Química Guilherme Martins Grosseli pela dedicação e ajuda na determinação por cromatografia dos fármacos das amostras dos reatores.

À minha família, onde verdadeiramente encontro amor e apoio incondicional. Aos meus pais Sérgio e Marli por serem a minha base e o meu porto seguro. Vocês sempre foram presentes e essenciais em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Marcelo que sempre foi a minha referência de disciplina, humildade e persistência junto à minha cunhada Dayanne por sempre me incentivar o caminho do estudo e da formação acadêmica. Ao meu pequeno sobrinho Caio que me proporciona alegria e por ser uma luz em meu caminho, desde o dia que te conheci, minha vida já não é mais a mesma.

Às minhas avós, materna, Terezinha de Melo Pires por ser muito mais do que avó, por ter me dedicado tanto amor, carinho e por ter desejado tanto que esse momento chegasse. E à minha avó paterna Maria Aparecida Araújo Pirete (*in memorium*) por ter sido o meu acalanto e pelos saudosos almoços de domingo.

Ao Bruno César que esteve ao meu lado nos momentos mais felizes e difíceis, pela paciência, companheirismo, dedicação e por ter me dado muita força e esperança. Com certeza, você contribuiu para o meu amadurecimento e transformou a minha vivência em São Carlos em uma fase mais leve e divertida. À sua família, em especial ao Edmar César, Sandra Maria e Mariana Rocha que sempre me incentivaram e torceram por mim e pelo meu sucesso profissional, obrigada por me fazerem enxergar o meu potencial, por todo carinho, atenção, escuta, risadas e orações. Enfim, obrigada por tudo.

Aos meus amigos mineiros Denici, Hélio, Alessandra, Alan e Pedro por momentos super agradáveis, sou agraciada por tê-los em minha vida. Aos meus amigos que tive a honra de

conviver no laboratório: Lili (grande companheira das bateladas), Lucas Fuess, Cris, Marina, Rafaela, Paulinha, Luana, Jaque, Jean, Jenny, Rodrigo, Rafael, Danilo. Com toda certeza, vocês deixarão muitos ensinamentos preciosos.

Um agradecimento especial a minha querida amiga Maria Eduarda, cuja amizade e consideração jamais esquecerei. Obrigada por ter acreditado tanto em mim e por ter me ajudado no caminho da fé. Aos meus colegas Henrique, Caroline e Franciele que sempre estiveram dispostos a me ajudar na operação do reator, e pela parceria na confecção dos artigos.

Aos técnicos Oscar da Silva pela construção do reator e ao Alcino pela manutenção de bombas e instalações utilizadas nesta pesquisa. Agradeço-lhes pela excelência em todos os serviços prestados durante o desenvolvimento do trabalho.

À Industria de Motores Volkswagen (São Carlos-SP) por conceder o lodo aeróbio de sistema de lodos ativados, utilizado como inóculo desta pesquisa. Em especial ao Davilson e ao Osvaldo que sempre estiveram dispostos a coletar este material e a ajudar em quaisquer serviços necessários.

Às técnicas do laboratório, Carolina Sabatini (Carol), Maria A. Adorno (Janja), Eloísa Pozzi (Elô) e Isabel K. Sakamoto (Bel), pela paciência e pelo auxílio.

À Adriana e Camila pela ajuda no início desta jornada e junto as sugestões e à cuidadosa leitura perante a qualificação do doutorado. E aos membros titulares da banca de defesa desta tese pelas valiosas contribuições para este estudo.

À Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em 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 00188882.328915/2019-01, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2015/06246-7.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Pirete, L. M. **Influência do etanol e nitrato na degradação de diclofenaco e ibuprofeno em reator em batelada e contínuo de leito fluidificado: ênfase na caracterização taxônomica e de possíveis vias metabólicas.** 2022.275p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

O diclofenaco (DCF) e ibuprofeno (IBU) são fármacos anti-inflamatórios e recalcitrantes em reatores biológicos de Estações de Tratamento de Esgoto. A ocorrência destes micropoluentes pode causar impactos adversos à saúde pública e aos níveis tróficos do ecossistema aquático, contribuindo para a contaminação de mananciais e sistemas de abastecimento de água. Dessa forma, a remoção desses compostos foi investigada em reatores bateladas e em reator contínuo de leito fluidificado (RLF) utilizando como inóculo biomassa de lodos ativados. A remoção dos fármacos foi avaliada sob condições desnitrificantes em reatores em batelada, a partir das variáveis ibuprofeno ($41 \pm 5,6 - 122,8 \pm 5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), etanol ($95,3 \pm 21,9 - 233,3 \pm 0,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) e nitrato ($95,9 \pm 5,0 - 264,0 \pm 6,0 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$), via delineamento do composto central rotacional (DCCR), conforme metodologia de superfície resposta. Nessa fase experimental, foram obtidas remoção de IBU ($97,5 \pm 3,1\%$) com $95,9 \pm 5,0 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $109,9 \pm 1,6 \text{ } \mu\text{gIBU L}^{-1}$ e $180,8 \pm 11 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. Além disso, sob a mesma fonte de inóculo, foi realizado o DCCR para a remoção do diclofenaco, considerando as variáveis nitrato ($95,9 \pm 2,1 - 250 \pm 10,2 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$), diclofenaco ($57 \pm 2,0 - 146,3 \pm 22,3 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$) e etanol ($100,5 \pm 25,3 - 278,9 \pm 13,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$). Sob tais condições, obteve-se total remoção do nitrato e $17,5 \pm 2\%$ de remoção do DCF em $176,6 \pm 5,2 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$, $76,8 \pm 3,7 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $130,0 \pm 2,5 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. Na caracterização microbiana, foram identificadas *Pseudomonas*, *Dechloromonas* e *Zoogloea* e relacionadas à degradação do DCF e IBU. Avaliou-se também a remoção dos fármacos em RLF alimentado com esgoto sanitário do município de São Carlos-SP suplementado com etanol como co-substrato e nitrato como acceptor de elétrons. O RLF foi operado em quatro fases: (I) tempo de detenção hidráulica (TDH) de $18 \pm 3\text{h}$ com etanol ($74,7 \pm 35,5 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrato ($136,0 \pm 59 \text{ mg L}^{-1}$); (II) TDH de $18 \pm 2\text{h}$ com etanol ($91,4 \pm 30,9 \text{ mg L}^{-1}$), nitrato ($89 \pm 14 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($120 \pm 25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($167,7 \pm 35 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (III) TDH de $12 \pm 1\text{h}$ com etanol ($100 \pm 18,2 \text{ mg L}^{-1}$), nitrato ($100 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($90,1 \pm 36 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($148,9 \pm 33 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (IV) TDH de $18 \pm 2\text{h}$ com etanol ($89,7 \pm 39,2 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($185,6 \pm 29,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($150 \pm 44,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) afluente. Além disso, foi realizada a análise de remoção do surfactante aniônico linear alquilbenzeno sulfonado (LAS) no esgoto sanitário. A fase IV foi predominantemente acidogênica, na qual se obteve maior remoção de diclofenaco ($52,9 \pm 11,4\%$) e de ibuprofeno ($55,8 \pm 11,4\%$). A diminuição do TDH de $18 \pm 2\text{h}$ para $12 \pm 1\text{h}$ não influenciou na desnitrificação, mas causou redução da eficiência de remoção dos fármacos e da remoção de matéria orgânica. Para remoção de LAS, observou-se que a máxima remoção do surfactante ocorreu na fase com adição de nitrato com máxima eficiência de $56,6 \pm 24,7\%$ a partir de $2,6 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$ afluente. Nas fases I, II e III foram identificados gêneros desnitrificantes na biomassa do RLF, e na fase IV, foram identificadas bactérias acidogênicas.

Palavras-Chave: Planejamento fatorial. Fármacos. Desnitrificação. Esgoto sanitário. Micropoluentes emergentes. LAS.

ABSTRACT

Pirete, L. M. **Influence of ethanol and nitrate on the degradation of diclofenac and ibuprofen in a batch and continuous fluid bed reactor: emphasis on taxonomic characterization and possible metabolic pathways.** 2022. 283p. Thesis (Doctorate) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

Diclofenac (DCF) and ibuprofen (IBU) are anti-inflammatory and recalcitrant compounds in biological reactors of Wastewater Treatment Plants. The occurrence of these micropollutants can cause adverse impacts to public health and trophic levels of aquatic ecosystem. The removal of these compounds was investigated in batch reactors and in fluidized bed reactor (RLF) using activated sludge biomass as inoculum. The drugs removal was evaluated under denitrifying conditions in batch reactors, based on the ibuprofen ($60 - 80 \mu\text{g L}^{-1}$), ethanol ($130 - 230 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) and nitrate ($130 - 230 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$), via rotational central compound design (RCCD), according to response surface methodology. In addition, under the same denitrifying conditions and inoculum source, RCCD experimental design was carried out to optimize the removal of diclofenac, considering the nitrate ($130 - 230 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$), diclofenac ($60 - 100 \mu\text{gDCF L}^{-1}$) and ethanol ($130 - 230 \text{ mgEtOH L}^{-1}$). In this experimental phase, IBU removal ($97,5 \pm 3,1\%$) was obtained with $95,9 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $109,9 \mu\text{gIBU L}^{-1}$ and $110,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. Under such conditions, complete removal of NO_3 and $17,5 \pm 2\%$ DCF removal was obtained at $176,6 \pm 5,2 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$, $76,8 \pm 3,7 \mu\text{gDCF L}^{-1}$ and $130,0 \pm 2,5 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. In the characterization of the microbial composition, *Pseudomonas*, *Dechloromonas* and *Zoogloea* were identified and related to the degradation of DCF and IBU. The pharmaceuticals removal also was evaluated in RLF fed with sanitary sewage from São Carlos-SP supplemented with ethanol as co-substrate and nitrate as electron acceptor. The RLF was operated in four phases: (I) hydraulic retention time (HRT) of $18 \pm 3 \text{ h}$ with ethanol ($74,7 \pm 35,5 \text{ mg L}^{-1}$) and nitrate ($136,0 \pm 59 \text{ mg L}^{-1}$); (II) HRT $18 \pm 2 \text{ h}$ with ethanol ($91,4 \pm 30,9 \text{ mg L}^{-1}$), nitrate ($89 \pm 14 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenac ($120 \pm 25 \mu\text{g L}^{-1}$) and ibuprofen ($167,7 \pm 35 \mu\text{g L}^{-1}$); (III) HRT de $12 \pm 1 \text{ h}$ with ethanol ($100 \pm 18,2 \text{ mg L}^{-1}$), nitrate ($100 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenac ($90,1 \pm 36 \mu\text{g L}^{-1}$) and ibuprofen ($148,9 \pm 33 \mu\text{g L}^{-1}$); (IV) HRT of $18 \pm 2 \text{ h}$ with ethanol ($89,7 \pm 39,2 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenac ($185,6 \pm 29,9 \mu\text{g L}^{-1}$) and ibuprofen ($150 \pm 44,4 \mu\text{g L}^{-1}$) influent. In addition to the drugs, sulfonated linear alkylbenzene (LAS) was also evaluated, which is part of the sanitary sewage composition. Phase IV was predominantly acidogenic, in which highest removal of diclofenac ($52,9 \pm 11,4\%$) and ibuprofen ($55,8 \pm 11,4\%$) was obtained. The decrease of HRT from $18 \pm 2 \text{ h}$ to $12 \pm 1 \text{ h}$ did not influence denitrification but caused a reduction in drug removal, ethanol consumption, and organic matter removal. According to the removal efficiency of LAS, it was observed that the maximum removal of the surfactant occurred in the phase with added nitrate (Phase I, II and III) with maximum efficiency of $56,6 \pm 24,7\%$ from $2,6 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$ influent. In the nitrate feeding phases (Phases I, II and III) denitrifying genera were identified in RLF biomass while in phase IV, acidogenic bacteria were identified.

Keywords: Factorial design. Drugs. Denitrification. Sanitary sewage. Emerging micropollutants. LAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Principais fontes e destinos dos poluentes emergentes.....	42
Figura 2.2. Principais metabólitos do diclofenaco.....	46
Figura 2.3. Principais metabólitos do ibuprofeno.....	48
Figura 4.1. Fluxograma geral dos experimentos em reatores em batelada e reator contínuo de leito fluidificado.....	97
Figura 4.2. Avaliação do potencial desnitrificante em reatores em batelada.....	101
Figura 4.3. Esquema experimental para avaliação da remoção de ibuprofeno em reatores em bateladas.....	104
Figura 4.4. Configuração do RLF.....	109
Figura 4.5. Fotografias do RLF: (a) Sistema distribuidor de fluxo ascendente, (b) Tela de proteção do leito na região inferior do RLF e (c) Leito do reator com areia.....	110
Figura 4.6 Configuração da alimentação do RLF: (a) Caixa de alimentação, (b) Bomba centrífuga de alimentação e (c) Tratamento preliminar da ETE.....	111
Figura 4.7. Fluxograma experimental da operação do RLF.....	113
Figura 4.8. Circuito de Inoculação do RLF: (a) Desenho esquemático e (b) Fotografia do leito do RLF.....	114
Figura 4.9. Procedimento da extração de fármacos.....	120
Figura 5.1. Variação temporal de remoção de nitrato dos reatores em batelada em condições controles.....	127
Figura 5.2. Variação temporal de remoção de matéria orgânica dos reatores em batelada em condições controles.....	128
Figura 5.3. Variação temporal de remoção de nitrato dos reatores em batelada das condições controles.....	131
Figura 5.4. Remoção de etanol nos ensaios do DCCR.....	137
Figura 5.5. Superfície resposta e de contorno da remoção de diclofenaco (a e b) em função das concentrações de nitrato, diclofenaco e etanol.....	140
Figura 5.6. Variação temporal da remoção de nitrato nas condições dos ensaios do DCCR.....	140
Figura 5.7. Velocidade inicial da desnitrificação em função da concentração de nitrato.....	142

Figura 5.8. Velocidade inicial da desnitrificação em função da concentração de diclofenaco	143
Figura 5.9. Balanço de massa do diclofenaco nos reatores em batelada	144
Figura 5.10. Variação temporal da remoção do nitrato em reator em batelada da condição otimizada.	145
Figura 5.11. Abundância relativa dos filos (A) e gêneros (B) identificados nos reatores na condição controle e otimizada	148
Figura 5.12. Vias metabólicas envolvidas na degradação de DCF em reatores em batelada contendo etanol e nitrato. Os números EC apresentados entre colchetes, referentes às enzimas potencialmente envolvidas em cada reação, foram inferidos pelo pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6 e via base de dados BRENDA	153
Figura 5.13. Valores iniciais, finais e percentual de remoção de ibuprofeno (A), matéria orgânica (B) e nitrato (C) dos reatores em batelada nas condições controle 1 ($122 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$), controle 2 ($114 \pm 16 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 191,4 \pm 22 \text{mgEtOH L}^{-1}$) e controle 3 ($106 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 99 \pm 0,1 \text{mgNO}_3 \text{L}^{-1}$)	157
Figura 5.14 Superfície de resposta (A) e superfície de contorno (B) para a remoção de ibuprofeno em função da concentração de ibuprofeno e etanol.	163
Figura 5.15. Valores de matéria orgânica (A) e etanol (B) dos ensaios de DCCR. Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.	165
Figura 5.16. Variação temporal da remoção de nitrato dos ensaios de DCCR: (A) ensaios 1-3, (B) 4-6, (C) 7-9, (D) 10-12, (E) 13 e 14 e (F) 15-19. Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata	167
Figura 5.17. Velocidade de remoção de nitrato (dx) em relação às variáveis de concentração de nitrato (A), ibuprofeno (B) e etanol (C)	169
Figura 5.18. Variação temporal da remoção de nitrato em reator em batelada da condição otimizada com ibuprofeno ($104,2 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$), etanol ($110,6 \pm 15,6 \text{mgEtOH L}^{-1}$) e nitrato ($100,9 \pm 0,1 \text{mgNO}_3 \text{L}^{-1}$).....	171
Figura 5.19. Curva de rarefação da distribuição populacional microbiana. Controle 1= IBU; controle 2= ibuprofeno + etanol; controle 3= ibuprofeno + nitrato; condição otimizada= ibuprofeno+ etanol + nitrato	172
Figura 5.20. Distribuição dos gêneros nos diferentes ensaios: Controle 1= ibuprofeno; controle 2= ibuprofeno + etanol; controle 3= ibuprofeno + nitrato; condição otimizada= ibuprofeno + etanol + nitrato.....	173

Figura 5.21. Representação gráfica dos gêneros identificados nas amostras do reator controle 1 (ibuprofeno); controle 2 (ibuprofeno + etanol); controle 3 (ibuprofeno + nitrato); condição otimizada (ibuprofeno + etanol + nitrato).	175
Figura 5.22. Principais vias metabólicas envolvidas na degradação de ibuprofeno em reatores contendo etanol e nitrato. As vias foram estimadas de acordo com os KO inferidos por meio do pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6. As proporções foram calculadas de acordo com o número total de KO obtidos para cada amostra analisada.	178
Figura 5.23. Vias metabólicas envolvidas em reatores aplicados a degradação de ibuprofeno contendo etanol e nitrato. Os números EC apresentados entre colchetes, referentes às enzimas potencialmente envolvidas em cada reação, foram inferidos pelo pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6 e via base de dados BRENDA	180
Figura 5.24. Variação temporal da remoção da matéria orgânica durante a inoculação do RLF	183
Figura 5.25. Variação temporal da remoção de nitrato durante a inoculação do RLF	183
Figura 5.26. Variação temporal dos valores de pH durante a inoculação do RLF	184
Figura 5.27. Variação temporal dos valores de alcalinidade total durante a inoculação do RLF	184
Figura 5.28. Valores de matéria orgânica nas fases diferentes fases operacionais do RLF ...	188
Figura 5.29. Valores de remoção de matéria orgânica durante as diferentes fases operacionais do RLF.....	188
Figura 5.30. Carga orgânica volumétrica nas fases I, II, III e IV de operação do RLF	189
Figura 5.31. Eficiência de remoção de nitrato nas fases operacionais do RLF.....	190
Figura 5.32. Distribuição percentual de diclofenaco e ibuprofeno recuperado no efluente, adsorvido e degradado nas fases operacionais III e IV.	193
Figura 5.33. Variação temporal dos valores de pH durante as fases de operação do RLF	196
Figura 5.34. Valores de AOV e álcool do efluente nas diferentes fases de operação do RLF	197
Figura 5.35. Distribuição de sólidos totais afluente e efluente nas diferentes fases de operação do RLF.....	199
Figura 5.36. Representação gráfica dos microrganismos identificados em maior abundância relativa nas amostras de inóculo e diferentes fases de operação do RLF.....	203
Figura 5.37. Principais KO envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos e/ou álcoois nas vias Glicolítica e Metabolismo do Piruvato em RLF aplicado à degradação de fármacos (ibuprofeno e diclofenaco) com etanol e nitrato. As KO foram estimadas a partir do pacote	

Tax4Fun2 versão 1.1.6. As proporções foram calculadas de acordo com o número total de KO obtidos para cada amostra analisada.....208

Figura 5.38. Principais vias metabólicas envolvidas na degradação de ibuprofeno e diclofenaco em reator RLF contendo etanol e/ou nitrato. As vias foram estimadas de acordo com as KO inferidas por meio do pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6. As proporções foram calculadas de acordo com o número total de KO obtidos para cada amostra analisada.....211

Figura 5.39. Potenciais vias metabólicas envolvidas em RLF aplicado à degradação de fármacos (diclofenaco e ibuprofeno) contendo etanol e/ou nitrato. Os números EC entre colchetes são referentes às enzimas potencialmente envolvidas em cada reação, e foram inferidos pelo pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6 e via base de dados BRENDA.212

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Principais poluentes orgânicos e fontes de contaminação.....	40
Tabela 2.2. Estrutura molecular do diclofenaco.....	45
Tabela 2.3. Estrutura molecular do ibuprofeno.....	47
Tabela 2.4. Interpretação da constante de partição octanol-água.....	52
Tabela 2.5. Ocorrência do diclofenaco em esgoto sanitário.....	53
Tabela 2.6. Ocorrência do diclofenaco em águas superficiais.....	54
Tabela 2.7. Ocorrência do diclofenaco em águas superficiais (cont.).....	55
Tabela 2.8. Ocorrência do diclofenaco em águas subterrâneas, água potável e efluentes industriais.....	56
Tabela 2.9. Ocorrência do ibuprofeno em esgoto sanitário.....	57
Tabela 2.10. Ocorrência do ibuprofeno em esgoto sanitário (continuação).....	58
Tabela 2.11. Ocorrência do ibuprofeno em águas superficiais.....	59
Tabela 2.12. Ocorrência do ibuprofeno em águas subterrâneas, água potável e efluentes industriais.....	60
Tabela 2.13. Classificação ecotoxicológica conforme o coeficiente HQ.....	63
Tabela 2.14. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste.....	64
Tabela 2.15. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste. (cont.).....	65
Tabela 2.16. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste. (cont.).....	66
Tabela 2.17. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste. (cont.).....	67
Tabela 2.18. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em diferentes fontes de inóculos.....	68
Tabela 2.19. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em diferentes fontes de inóculos (cont.)....	69
Tabela 2.20. Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais.....	73
Tabela 2.21. Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).....	74
Tabela 2.22. Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).....	75
Tabela 2.23. Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).....	76
Tabela 2.24. Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).....	77

Tabela 2.25. Principais gêneros associados a degradação de fármacos	83
Tabela 2.26. Principais gêneros associados a degradação de fármacos (cont.).....	84
Tabela 2.27. Principais aceptores de elétrons aplicados em diferentes configurações de reatores.	88
Tabela 4.1. Composição do meio Dolfing.....	98
Tabela 4.2. Composição da solução de micronutrientes	99
Tabela 4.3. Condições dos testes em reatores em batelada	99
Tabela 4.4. Ensaio de remoção do diclofenaco via DCCR em reatores em batelada	102
Tabela 4.5. Condições do DCCR preditas para remoção de diclofenaco.....	103
Tabela 4.6 Coeficientes adotados no DCCR para o ensaio de remoção do ibuprofeno.....	105
Tabela 4.7 Condições via DCCR dos ensaios em reatores em batelada com ibuprofeno.	107
Tabela 4.8. Parâmetros operacionais do reator de leito fluidificado	108
Tabela 4.9. Fases de operação do reator RLF durante o período de inoculação (30 dias) e fases I-IV (70 dias).	115
Tabela 4.10 Análises físico-químicas dos ensaios do reator contínuo.	117
Tabela 4.11. Condições cromatográficas para detecção e quantificação do LAS.....	117
Tabela 4.12 Condições cromatográficas para quantificação dos fármacos	119
Tabela 4.13. Cálculos utilizados para análises de monitoramento.....	122
Tabela 5.1 Coeficientes cinéticos e remoção da matéria orgânica nos reatores em bateladas em condições controles.....	130
Tabela 5.2. Valores de remoção de nitrato, diclofenaco e etanol nos reatores em batelada sob condições controles.....	133
Tabela 5.3 Matriz DCCR para concentrações de nitrato (x1), diclofenaco (x2), etanol (x3) e eficiência de remoção do diclofenaco.	134
Tabela 5.4. Coeficientes de regressão do planejamento experimental.....	138
Tabela 5.5. ANOVA da remoção do diclofenaco obtido após os ensaios do DCCR.....	138
Tabela 5.6. Condições da validação experimental.	145
Tabela 5.7. Índices de diversidade para o Dominio Bacteria.	146
Tabela 5.8. Desempenho operacional dos reatores controle.	154

Tabela 5.9. Reações de oxidação e equivalentes teóricos de etanol e ibuprofeno.	156
Tabela 5.10 Eficiência de remoção de ibuprofeno dos reatores em batelada dos ensaios do DCCR	158
Tabela 5.11. ANOVA para os efeitos de nitrato (x1), ibuprofeno (x2) e etanol (x3) da remoção de ibuprofeno	160
Tabela 5.12 Coeficientes de regressão para a remoção de ibuprofeno.....	161
Tabela 5.13 Remoção, adsorção e degradação do ibuprofeno em reatores em batelada. Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.....	166
Tabela 5.14 Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada do DCCR da remoção de nitrato. A1= concentração inicial de nitrato; dx= velocidade de remoção de nitrato.	168
Tabela 5.15 Índices de diversidade do Dominio Bacteria	172
Tabela 5.16 Valores da série de sólidos totais do inóculo.....	182
Tabela 5.17. Parâmetros operacionais do RLF.....	185
Tabela 5.18. Valores de matéria orgânica afluyente e efluente do RLF	186
Tabela 5.19. Balanço de massa de Diclofenaco e Ibuprofeno em massa total e percentual...	192
Tabela 5.20 Valores de LAS afluyente e efluente do RLF.....	194
Tabela 5.21. Valores de alcalinidade afluyente e efluente do RLF.....	196
Tabela 5.22. Ácidos orgânicos voláteis em cada fase operacional do RLF	198
Tabela 5.23. Série sólidos afluyente e efluente ao RLF	199
Tabela 5.24. Descrição das hipóteses, resultados obtidos e conclusões.....	217

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4'OH-DCF	4-hidroxi-diclofenaco
5'OH-DCF	5-hidroxi-diclofenaco
ABES	Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
Ác	Ácido
ADWG	<i>Australian Drinking Water Guidelines</i>
AI	Alcalinidade intermediária
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
AOV	Ácidos Orgânicos Voláteis
AP	Alcalinidade parcial
APHA	<i>American Public Health Association</i> (Associação Americana de Saúde Pública)
ATP	Trifosfato de Adenosina
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CA-HA	carboxi-ibuprofeno
CA-HA	carboxi-ácido-hidratrópico
CENO	<i>no effect concentration</i>
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
-CH₃	Metila
CO₂	Dióxido de carbono
COT	Carbono orgânico total
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DCCR	Delineamento do Composto Central Rotacional
DCF	Diclofenaco

DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EC₁₀	efeito de toxicidade em 10% da população analisada
EC₅₀	<i>Effective Concentration</i>
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EGSB	<i>Expanded Granular Sludge Bed</i>
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EtOH	Etanol
Fe⁺³	Ferro
GABA	Gabapentina
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HQ	Coefficiente de risco
IBU	Ibuprofeno
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
K_d	Coefficiente de distribuição água-lodo
K_{ow}	Coefficiente de partição octanol/água
LAE	linear álcool etoxilado
LAS	linear alquilbenzeno sulfonado
LC₅₀	<i>Lethal Dose</i> (dose letal para 50% dos indivíduos expostos)
Log K_{ow}	Coefficiente de partição octanol/água em função logarítmica
LPB	Laboratório de Processos Biológicos (EESC/USP)
MBR	Membranas

MM	Assa molecular
MPOs	Micropoluentes orgânicos
N₂	Nitrogênio molecular
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida
Nar	nitrato redutase
-NH₂	Amina
NHMRC	Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica
Nir	nitrito redutase
N-NO₃	Nitrogênio ligado a nitrato
NO₃⁻	Nitrato
Nor	óxido nítrico redutase
Nos	óxido nitroso redutase
NRMMC	Conselho Ministerial Nacional de Gestão de Recursos Naturais
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
OD	Oxigênio Dissolvido
-OH	Hidroxila
OH-IBU	hidroxi-ibuprofeno
ONU	Organização das Nações Unidas
OTU	<i>Operation taxonomic unit</i> (Unidades taxonômicas operacionais)
pKa	Constante de acidez
PNEC	Avaliação de Risco Ecológico
POA	Processos Oxidativos Avançados
PPCPs	Produtos de Cuidado Pessoal
p-valor	probabilidade de se observar uma diferença tão grande ou maior do que a que foi observada sob a hipótese nula

Q	Vazão
RLF	Reator de Leito Fluidificado
REACH	Restrição, Avaliação, Autorização e Redução dos produtos químicos
RNA	ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossomal
SAAE	Serviço Autônomo de Água e Esgoto
SFX	sulfametoxazol
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SO₄⁻²	Sulfato
SPE	<i>solid-phase extraction</i>
ST	sólidos totais
STF	sólidos totais fixos
STV	sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
UE	União Européia
UPLC-	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de
MS/MS	Massas
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
V	Volume

LISTA DE UNIDADES

°C	graus Celsius
cm	centímetros
m	metros
M	molar
g L⁻¹	grama por litro
µg L⁻¹	micrograma por litro
ng L⁻¹	nanograma por litro
ng g⁻¹	nanograma por grama
L	litro
h	hora
atm	Pressão atmosférica
g	grama
g mol⁻¹	massa em gramas por mol
m²	Metro quadrado
min	Minutos
m³	Metro cúbico
µgIBU L⁻¹	nanograma de ibuprofeno por litro
µgDCF L⁻¹	nanograma de diclofenaco 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
µL	microlitro
%	porcentagem

μmol	massa molecular de uma substância expressa em micromol
v v^{-1}	volume por volume
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	37
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
2.1 Micropoluentes orgânicos – ocorrências e normativas	39
2.1.1 Diclofenaco	45
2.1.2 Ibuprofeno	46
2.2 Ocorrência ambiental do diclofenaco e ibuprofeno	48
2.3 Ecotoxicidade do diclofenaco e ibuprofeno	61
2.4 Degradação do diclofenaco e ibuprofeno	70
2.5 Microrganismos envolvidos na degradação do diclofenaco e ibuprofeno	78
2.6 Aceptores de elétrons e co-substratos metabólicos	85
2.7 Remoção de diclofenaco e ibuprofeno via redução do nitrato	89
2.8 Reator de leito fluidificado	93
3 HIPÓTESES E OBJETIVOS	95
Objetivo principal	95
Objetivos específicos	96
4. MATERIAL E MÉTODOS	97
4.1 Fluxograma experimental	97
4.2 Inóculo	98
4.3 Meio de cultura	98
4.4 Fármacos	99
4.5 Ensaíos em bateladas	99
4.5.1 Avaliação da influência do etanol na remoção de nitrato em reatores controles .	100
4.5.2 Ensaíos com diclofenaco	100
4.5.1 Avaliação da remoção do diclofenaco em reatores em batelada	101
4.5.3 Ensaíos em reatores em batelada com ibuprofeno	104
4.5.3.1 Avaliação da remoção do ibuprofeno em reatores em bateladas em condições controles	104
4.5.3.2 Avaliação da remoção do ibuprofeno em reatores em bateladas	105
4.6 Reator de leito fluidificado	108
4.6.1 Esgoto sanitário	110
4.6.2 Operação do RLF	112
4.6.2.1 Fases de operação do reator contínuo	112
4.6.2.2 Inoculação	114
4.6.2.3 Etapas de operação	115
4.7 Métodos analíticos e cromatográficos	116

4.8	Cálculos	121
4.8.1	Parâmetros cinéticos dos reatores em bateladas.....	121
4.8.2	Parâmetros de monitoramento.....	121
4.8.3	Balanço de massa	123
4.8.4	Análises estatísticas.....	124
4.9	Caracterização taxonômica	125
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
5.1	Reatores em batelada.....	127
5.1.1	Avaliação da influência do etanol na remoção de nitrato em reatores controles ...	127
5.2	Ensaio com diclofenaco	129
5.2.1	Ensaio em condições controles.....	129
5.2.2	Delineamento do composto central rotacional.....	134
5.2.3	Remoção de nitrato nas condições do DCCR.....	140
5.2.4	Balanço de massa	143
5.2.5	Validação do modelo.....	144
5.2.6	Caracterização da comunidade microbiana.....	145
5.3.	Ensaio com ibuprofeno	154
5.3.1	Ensaio controle de remoção de ibuprofeno em diferentes condições nutricionais 154	
5.3.2	Otimização da remoção de ibuprofeno em ensaios do DCCR.....	157
5.3.3	Balanço geral da remoção de ibuprofeno dos reatores em batelada em condições controles e DCCR	165
5.3.3	Remoção de nitrato nas condições DCCR	166
5.3.4	Validação experimental.....	170
5.3.6	Diversidade microbiana	171
5.4	Operação do reator de leito fluidificado	182
5.4.1.	Inoculação	182
5.4.2.	Monitoramento do RLF.....	184
5.4.2.1	Remoção da matéria orgânica.....	186
5.4.2.2	Remoção de nitrato.....	189
5.4.2.3	Remoção de diclofenaco, ibuprofeno e balanço de massa	191
5.4.2.4	Remoção de LAS.....	194
5.4.2.5	pH e alcalinidade	194
5.4.2.6	Ácidos orgânicos voláteis.....	196
5.4.2.7	Sólidos	199
5.4.2.8	Caracterização microbiana	200
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	213
7	RESPOSTAS ÀS HIPÓTESES.....	215
8	CONCLUSÕES	218
9	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	218
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	219

1. INTRODUÇÃO

As tecnologias de tratamento de esgoto sanitário têm sido exploradas com o intuito de reduzir ou eliminar os contaminantes em águas residuárias. As limitações quanto à remoção dos micropoluentes são observadas em processos biológicos em ETEs, além da crescente preocupação com os compostos orgânicos emergentes no ciclo de uso da água (SARIZADEH et al., 2021).

O debate sobre os contaminantes emergentes tem sido relevante em razão da toxicidade e potencial recalcitrante quanto aos microrganismos. Na heterogeneidade da composição dos efluentes líquidos, os fármacos são de alto consumo e emergente potencial para gerar impactos adversos à qualidade da água e à saúde pública.

Em relação a ocorrência dos fármacos no ambiente, diclofenaco e ibuprofeno foram quantificados em 0,45 a 17,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto sanitário (GARCÍA-GALÁN et al., 2016; RAGASSI et al., 2020) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água residuária de indústria farmacêutica (SIM et al., 2011). Tais compostos farmacêuticos pertencem à classe dos analgésicos não esteroidais (AINEs), sendo os mais consumidos mundialmente, com variações de nomes comerciais, os quais também fazem parte da composição de outros medicamentos.

A complexidade e onerosa detecção e quantificação desses micropoluentes em diferentes matrizes, como águas superficiais, subterrâneas e em solos, justificam a dificuldade de monitoramento frequente, o que dificulta ou atrasa a implementação de legislações vigentes. Dessa forma, estão incluídos entre os micropoluentes emergentes e podem causar efeitos adversos ao ambiente (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

Por serem compostos biologicamente ativos, os fármacos são produzidos com o intuito de provocar alterações biológicas em organismos alvos. No entanto, com a exposição progressiva e contínua desses compostos nas águas residuárias, os organismos vivos não alvos podem sofrer efeitos adversos, podendo, assim, alterar o equilíbrio ecossistêmico da fauna aquática, como efeitos na mobilidade e crescimento de espécies de algas, invertebrados e peixes (GHATTAS et al., 2017).

Quanto à degradação de fármacos, segundo Fent et al (2006), seus compostos ativos podem ser adsorvidos pela estrutura lipídica das bactérias, por meio de interações hidrofóbicas, bem como assimilados nas cargas negativas dos polissacarídeos estruturais de biofilmes microbianos.

A degradação dos micropoluentes pode ocorrer em condição aeróbia, anaeróbia e anóxica e pode ser favorecida por fontes de carbono facilmente degradáveis, por meio do cometabolismo. Assim, o substrato é fundamental para o desenvolvimento das populações microbianas, o que pode resultar em maior degradação dos compostos tóxicos e recalcitrantes. Devido às baixas concentrações dos fármacos no esgoto sanitário, estes compostos não são considerados como fontes primárias de carbono e energia para os microrganismos, tornando necessário o cometabolismo com a suplementação de fontes de substrato para a manutenção da biomassa e indução de enzimas correspondentes e cofatores para a degradação (Chiron and Duwig, 2016; Sun et al., 2019; Wei et al., 2014).

O cometabolismo tem sido investigado em consórcios microbianos para a degradação de fármacos em sistemas biológicos de tratamento de efluentes (Arias et al., 2018; Cydzik-Kwiatkowska and Zielińska, 2016; Gy Pló sz et al., 2012; Kruglova et al., 2014). Nesse processo, os fármacos não são utilizados como fontes primárias de carbono, visto que são formados por estruturas complexas para degradação. Com isso, fontes suplementares de carbono, prontamente disponíveis, tais como etanol e metanol podem induzir a produção de enzimas que viabilizam a metabolização dos compostos recalcitrantes.

A desnitrificação tem sido bastante estudada em sistemas de tratamento de águas residuárias para a remoção biológica de nutrientes e de compostos recalcitrantes. A aplicação das bactérias desnitrificantes é uma alternativa atrativa para a remoção de fármacos, visto que há indicação do uso de bactérias anóxicas para a degradação de diversos poluentes orgânicos e de estrutura complexa, tais como surfactantes aniônicos (Andrade et al., 2017), compostos derivados do petróleo, como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno – BTEX (Gusmão et al., 2007) e em aditivos industriais (Cydzik-Kwiatkowska and Zielińska, 2016; Liu et al., 2020). Dessa forma, a utilização da biomassa desnitrificante é uma alternativa atrativa para a degradação do diclofenaco e do ibuprofeno. Este fármaco é constituído por dois anéis aromáticos e um grupamento amina e pode ser cometabolizado com o etanol via remoção do nitrato (SCHIMMELPFENNIG et al., 2012; ARIAS et al., 2018).

Dentre os reatores biológicos estudados, a configuração de leito fluidificado é uma alternativa promissora no tratamento de compostos recalcitrantes devido, principalmente, à diluição do composto tóxico pela recirculação do efluente, o qual favorece que concentração tóxica não atinjam o biofilme. Além disso, nesse sistema tem-se a imobilização de microrganismos em biofilme aderido ao meio suporte, favorecendo o

contato da biomassa com o substrato, o que contribui para maior transferência de massa e degradação de compostos orgânicos. Assim, a eficiência do tratamento é relacionada com a formação e o desenvolvimento do biofilme, vazão afluyente e as características do meio suporte (ANDRADE et al., 2017b; MACEDO et al., 2020).

Dessa forma, estudos de processos de tratamento de efluentes e remoção de micropoluentes orgânicos emergentes são necessários, os quais se iniciam em escalas menores e laboratoriais, como em reatores em bateladas com efluentes sintéticos para viabilizar a aplicação em escala piloto com efluentes reais.

Ademais, destaca-se ainda a necessidade de estudo criterioso sobre a remoção e degradação dos fármacos em reatores em bateladas e em reator contínuo de leito fluidificado sob condições desnitrificantes com a avaliação dos parâmetros operacionais, presença de co-substrato e fonte nitrogenada.

Trata-se de pesquisa inédita, uma vez que foram avaliadas a remoção do diclofenaco e ibuprofeno em reator de leito fluidificado em escala aumentada com esgoto sanitário, instalado na Estação de Tratamento de Efluente Monjolinho de São Carlos (SP). Além da caracterização microbiana por sequenciamento do gene RNAr 16S do inóculo proveniente de sistema de lodos ativados, da biomassa dos reatores em bateladas e do biofilme do material suporte do reator contínuo ao final de cada fase operacional. A partir da análise e interpretação dos resultados de biologia molecular, foi possível associar a população microbiana identificada com o potencial de degradação do diclofenaco e ibuprofeno nas diferentes condições operacionais.

Dessa forma, este estudo confere na análise do processo de biorremediação dos micropoluentes ambientais, além da análise de possíveis rotas metabólicas para a degradação destes contaminantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micropoluentes orgânicos – ocorrências e normativas

Os micropoluentes orgânicos (MPOs) estão incluídos em ampla classe de substâncias químicas de origem sintética ou natural, os quais fazem parte da composição de medicamentos, produtos de cuidados pessoais, plastificantes, corantes, pesticidas e aditivos industriais, como apresentado na Tabela 2.1 (FARRÉ et al., 2008; BASHEER, 2018; PEÑA-GUZMÁN et al., 2019). A ocorrência dos micropoluentes em matrizes

ambientais (águas superficiais, subterrâneas e em solos) tem sido identificada em níveis traços, da ordem de nanogramas a microgramas, e dessa forma, justifica-se o emprego do prefixo ‘micro’ dos contaminantes emergentes por estar relacionado as essas baixas concentrações (PAL et al., 2014).

Tabela 2.1. Principais poluentes orgânicos e fontes de contaminação.

Classe	Exemplos	Fontes principais
Fármacos		
Antibióticos	Sulfametoxazol, lincomicina, trimetoprim	Esgoto sanitário, efluentes industriais e hospitalares; Escoamento superficial em locais de criações de animais confinados e aquicultura.
Anti-inflamatórios	Ácido acetilsalicílico, diclofenaco, paracetamol, cetoprofeno, ibuprofeno	
Drogas de uso psiquiátrico	Diazepam, fluoxetina, carbamazepina.	
β-Bloqueadores	Atenolol, propranolol, metoprolol, betaxolol	
Contraceptivos	Etinilestradiol, desogestrel, mestranol	
Produtos de higiene pessoal		
Protetores solares	Almíscares nitrados, policíclicos	Esgoto sanitário e efluentes industriais
Repelentes de insetos	N,N-dietiltoluamida	
Antissépticos	Triclosan, clorofeno	
Fragrâncias	Metilbenzeno, bifenilas	
Interferentes endócrinos		
Aditivos industriais	Ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA)	Esgoto sanitário, efluentes industriais e hospitalares; Escoamento superficial em locais de criações de animais confinados e aquicultura.
Hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA)	Benzo[a]pireno, antraceno, naftaleno	
Agrotóxicos	Atrazina, clordano, dieldrin	
Surfactantes		
Surfactantes não-iônicos	Nonilfenol etoxilado	Esgoto sanitário, efluentes industriais, água residuária de lavanderia
Surfactantes aniônicos	Linear Alquilbenzeno Sulfonato	

Fonte: Adaptado por Farré et al. (2008)

Esses compostos são biologicamente ativos e mesmo em concentrações traços e ultra traços podem ser metabolizados e bioacumulados por microrganismos, e consequentemente efeitos ecotoxicológicos nos metabolismos, tais como genotoxicidade, alteração na atividade endócrina, na maturação e crescimento dos organismos (OZDEMIR et al., 2015; PEÑA-GUZMÁN et al., 2019). Dessa forma, a busca de alternativas de remoção dos micropoluentes antes de serem descarregados no ambiente é fundamental, uma vez que sua ocorrência pode trazer impactos negativos à saúde humana e ambiental.

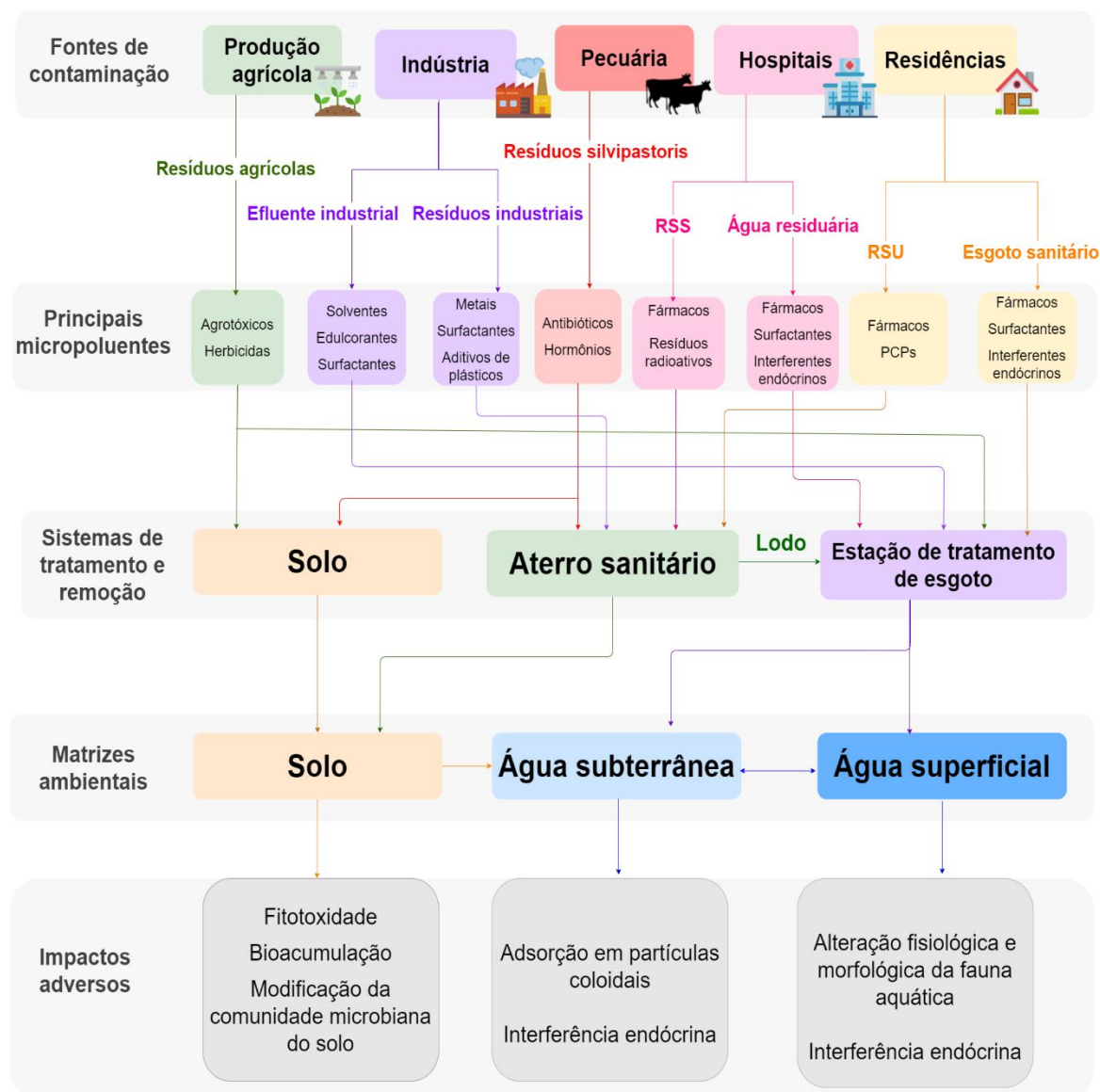
A ocorrência dos MPOs tem sido identificada em diferentes matrizes dos solos, águas superficiais e subterrâneas. Segundo Farré et al. (2008), a entrada desses compostos nos compartimentos ambientais depende do uso e da forma de aplicação, sendo que o principal meio de entrada é feito por fontes antrópicas através das descargas de efluentes, descarte de medicamentos em resíduos sólidos urbanos e por meio dos resíduos silvipastoris, como apresentado na Figura 2.1

As principais fontes de contaminação do solo podem advir das excretas de animais durante o tratamento veterinário e das águas de reuso para a agricultura que possam estar contaminadas por fármacos e pesticidas. O escoamento superficial e subterrâneo provocado pelas chuvas, tais resíduos agrícolas e silvipastoris são destinados aos solos, e podem alterar a microbiota com potencial de bioacumulação e bioconcentração nos organismos e plantas, além de acarretar alterações físico-químicas do solo, como pH e as interações hidrofóbicas e eletrostáticas das partículas de argila e areia (AMIN et al., 2013; BUTA et al., 2021).

As descargas de esgoto doméstico ou industrial *in natura* e o lançamento de efluentes, após tratamento, em corpos hídricos aceptores constituem as principais vias de entrada desses poluentes no ambiente. Em nível global, 80% das águas residuárias são lançadas diretamente nas matrizes ambientais na forma *in natura*, ademais 95% do esgoto doméstico não são tratados adequadamente em sistemas de tratamento (ETEs) (UNESCO World Water Assessment Program, 2019).

No Brasil, 53% da população equivalente, em média, a 107,5 milhões de pessoas têm acesso à coleta de esgoto sanitário. Deste percentual, estima-se que 46,3% são processadas em sistemas de tratamento (SNIS, 2019). Nas ETEs, a maioria dos micropoluentes emergentes não é degradada nos sistemas primários, secundários e terciários (KOSEK et al., 2020; HUBE; WU, 2021). A partir disso, são lançados totalmente ou parcialmente inalterados nos cursos hídricos (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018).

Figura 2.1. Principais fontes e destinos dos poluentes emergentes.



Fonte: Autora.

Em águas superficiais, os interferentes endócrinos foram detectados em concentrações entre $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$; anti-inflamatórios em $200,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e β -bloqueadores em $0,07$ a $126,00 \mu\text{g L}^{-1}$ em cursos hídricos de Campinas/SP, Belo Horizonte/MG e em São Carlos/SP (FERREIRA, 2005; AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

Além disso, os fármacos fazem parte da composição de efluentes de ETEs em concentrações de $0,10$ a $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ (PAL et al., 2010; PADHYE et al., 2014; COMBER et al., 2018;), em águas superficiais entre $0,02$ a $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ (FOCAZIO et al., 2016), em sedimentos a 85 ng g^{-1} (GRABICOVA et al., 2015) e em águas subterrâneas em 28 ng L^{-1} (WEN et al., 2014).

Os efluentes hospitalares também são fonte de contaminação de fármacos em ambientes aquáticos. Kleywegt et al. (2016) observaram 141 poluentes emergentes em efluentes hospitalares em Ontario (Canadá), como por exemplo, 200 ng L⁻¹ de cafeína, 593 ng L⁻¹ de anti-inflamatórios e 339 ng L⁻¹ de triclosan.

Aus Der Beek et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática sobre a ocorrência dos poluentes emergentes no mundo e observaram que os hormônios e anti-inflamatórios são os mais observados em países da América do Sul, principalmente o Brasil. Segundo os autores, dentre os analgésicos, diclofenaco e ibuprofeno foram observados em águas superficiais e subterrâneas em 13 países da América do Sul, nas faixas de concentrações entre 0,11 a 6,0 µg L⁻¹ e 0,18 a 11,7 µg L⁻¹, respectivamente.

A complexidade e a onerosa detecção de tais compostos em diferentes matrizes comprometem a ausência de monitoramento e a dificuldade do desenvolvimento de metodologias de quantificação, o que implica maior atraso na implementação das legislações vigentes e tecnologias de remoção (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

Em relação ao parâmetro normativo global, a Organização das Nações Unidas (ONU) destacou a meta “*clean water and sanitation*” do plano de sustentabilidade, promulgado em 2015, na qual retrata que deverão existir políticas públicas relacionadas à determinação de padrões e limites mais rígidos de descargas dos micropoluentes a serem complementados em nível regional e internacional até 2.030 (LUO et al., 2014; KOSEK et al., 2020).

Ademais, o Parlamento Europeu da União Europeia (UE) instituiu a diretiva 2000/60 que classifica 45 contaminantes emergentes em ordem prioritária para o descarte máximo de 10 ng L⁻¹, incluindo os metais pesados, pesticidas, ftalatos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e interferentes endócrinos. Além disso, a UE definiu o instrumento jurídico de Restrição, Avaliação, Autorização e Redução dos produtos químicos (REACH) na gestão de recursos hídricos que classifica os contaminantes emergentes por base no risco ambiental em potenciais carcinogênicos, tóxicos ou persistentes de degradação (DEBLONDE et al., 2014).

O departamento de pesquisa e desenvolvimento da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) elaborou uma lista com 104 grupos químicos e 12 contaminantes microbiológicos da água potável. Nesta lista, estão incluídos os micropoluentes metacloro, 1,7-dimetilxantina, bisfenol-A, cafeína, ibuprofeno, diclofenaco, triclosan e propranolol (USEPA, 2015). Ademais, desde 1996, tal

departamento tem analisado e identificado uma crescente quantificação dos fármacos nas áreas de pesquisas e desenvolvimento, atrelada ao crescimento populacional e ao aumento expressivo da produção desses compostos (USEPA, 1997).

Em âmbito administrativo e legislativo foi confeccionado relatório na Austrália, intitulado “*Australian Drinking Water Guidelines*” (ADWG), o qual contém diretrizes e valores máximos permitidos de pesticidas e metais pesados na água potável. Tal documento foi formulado pelo Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica (NHMRC) e pelo Conselho Ministerial Nacional de Gestão de Recursos Naturais (NRMMC), os quais não elencaram os hormônios, antibióticos e anti-inflamatórios como poluentes de interesse para regulamentação, pela onerosa detecção e quantificação desses compostos, que dificultariam o monitoramento (AUSTRALIAN GOVRMENT, 2015).

No Brasil, não há regulamentação vigente e nem programas oficiais voltados ao monitoramento dos poluentes emergentes em matrizes ambientais. Dentre os poluentes emergentes, a legislação brasileira contempla apenas 30 pesticidas pela Portaria da Consolidação nº 5/2017 e pela Resolução CONAMA 357/2005, sendo deficitária em critérios de qualidade para regulamentação dos demais micropoluentes emergentes, como anti-inflamatórios, hormônios e antibióticos.

Por meio da revisão da Portaria de Potabilidade do Ministério da Saúde, Consolidação nº 5/2017 e do Ministério do Meio Ambiente, foram elencadas discussões e estudos relacionados aos fármacos, especificamente, cafeína e bisfenol A, para que sejam incluídos como exigência no Plano de Segurança da Água. Esse levantamento foi conduzido por associações e órgãos do governo, como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que elaborou uma proposta a ser apresentada pela Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES). No entanto, mesmo com as discussões dessas diretivas, os compostos emergentes não foram enquadrados na Portaria brasileira por carecer de novos estudos quanto à ocorrência e distribuição destes poluentes em nível nacional.

Dessa forma, estudos relacionados à ocorrência e toxicidade dos micropoluentes emergentes são necessários para a definição de legislações e de limites máximos permitidos nos diferentes compartimentos ambientais.

2.1.1 Diclofenaco

O diclofenaco (DCF) está inserido nos grupos dos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) utilizado para fins humanos e veterinários com efeito de aliviar dores e inflamações. O seu consumo é crescente por estar na constituição de outros medicamentos e pela não obrigatoriedade de prescrição médica. Este fármaco é administrado como comprimidos orais ou em forma de gel, vendido comercialmente como Diclofenaco, Diclofenbeta, Diclomex e Voltaren (VIENO; SILLANPÄÄ, 2014). O consumo global é estimado em 940 toneladas/ano e em média, de 150,0 g por pessoa (ZIYLAN; INCE, 2011). O maior consumo de dose per capita deste fármaco foi observado na Alemanha (915 mg), Áustria (750 mg), Inglaterra (531 mg), e França (271 mg) (ZHANG; GEISSEN; GAL, 2008).

O diclofenaco (Tabela 2.2) é derivado do ácido fenilacético, cuja fórmula molecular é $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, 3-(2,6 dicloroanilino) fenil, massa molecular de $318,0 \text{ g mol}^{-1}$, coeficiente de partição octanol-água logKow de 4,51, indicativo de lipofilicidade e hidrofobicidade do composto. Segundo o Inmetro (2013), a volatilização deste fármaco não é expressiva no ambiente, com base no valor da constante de Henry ($4,7 \cdot 10^{-12} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$).

Tabela 2.2. Estrutura molecular do diclofenaco.

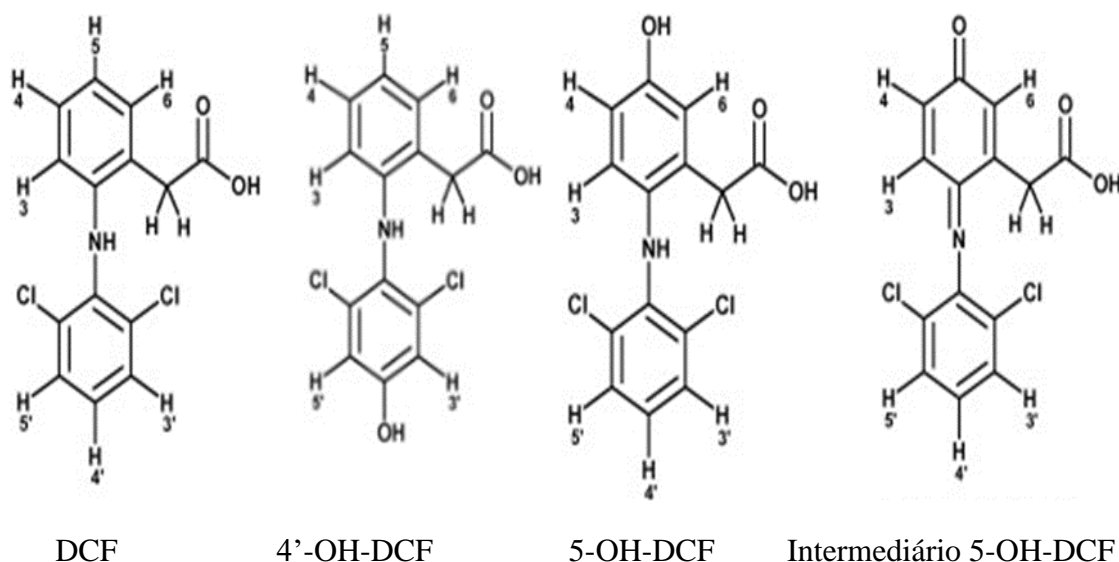
Fórmula molecular	Estrutura molecular
$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	

As seguintes características são observadas para o diclofenaco: baixa propriedade ácida e pka de 4,2; solubilidade variável de acordo com o pH do meio, sendo esse solúvel em água e em tampão fosfato em pH 6,8 e insolúvel em pH 1,2. O diclofenaco é mais solúvel em metanol que em água, ligeiramente solúvel em ácido acético e pouco solúvel

em acetona. A molécula do DCF é polar, devido à presença de átomos de N, O e Cl em sua estrutura, contribuindo para interações específicas com solventes (metanol, acetona e etanol) que afetam sua solubilidade.

Dentre os principais metabólitos oxidativos do diclofenaco tem-se o 4-hidroxi-diclofenaco (4'-OH-DCF), 5-hidroxi-diclofenaco (5'-OH-DCF), 4,5-dihidroxi-diclofenaco e 3-hidroxi-4-metoxi-diclofenaco, conforme Figura 2.2 (SHEN et al., 1999; ZHANG; GEIBEN; GAL, 2008). Em sistemas de tratamento de esgoto sanitário, outros metabólitos do diclofenaco foram observados, como aqueles de nitrificação em sistemas de nitrificação como o ácido diclorobenzoico e 2-((2,6-dicloro-fenil)-amina) (S; D, 2008; KOSJEK et al., 2009; LANGENHOFF et al., 2013).

Figura 2.2. Principais metabólitos do diclofenaco.



Fonte: (SHEN et al., 1999)

DCF= Diclofenaco, 4'-OH-DCF= 4-hidroxi-diclofenaco, 5'-OH-DCF = 5-hidroxi-diclofenaco

2.1.2 Ibuprofeno

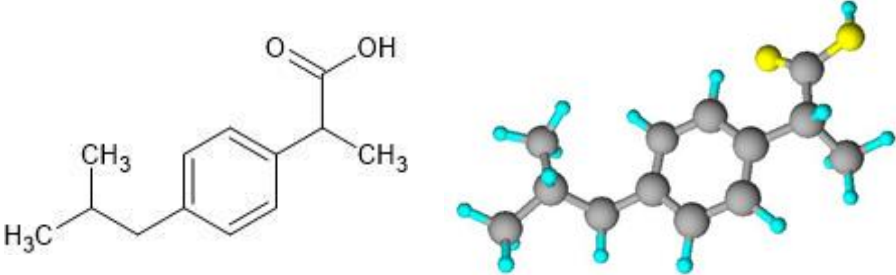
O ibuprofeno (IBU) também pertence ao grupo dos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), utilizado para fins humanos para o alívio de febre e dores musculares. O composto é derivado do ácido propiônico, cuja nomenclatura é a de ácido 2-(4-isobutilfenil)-propiônico, α -metil-4-2-metilpropil benzenoacético ou ácido p-isobutilhidratópico (BUSER; POIGER; MULLER, 1999). O seu consumo se dá por via

oral, sob forma de comprimidos sólidos (200, 300 e 600 mg), em soluções (50 mg mL⁻¹) ou em cremes e gel para aplicação local (BRASIL, 2010).

O ibuprofeno pode ser sintetizado na combinação de outros medicamentos, tais como o Ácido Acetilsalicílico e Paracetamol. Ademais, este fármaco está enquadrado na “*Essencial Drug List*” como um dos principais produtos farmacêuticos consumidos segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (LH et al., 2007).

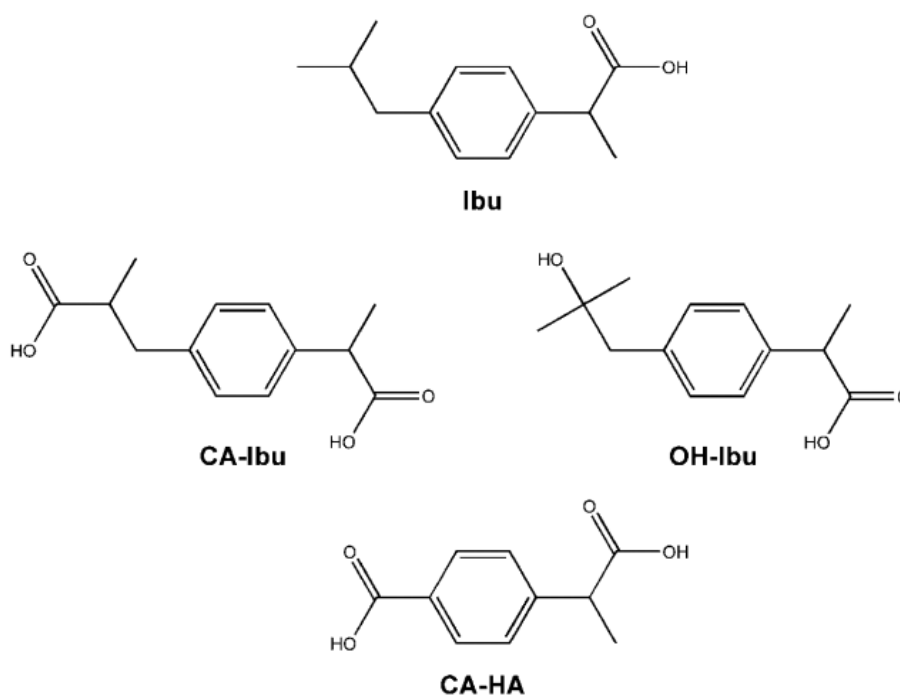
A fórmula molecular do ibuprofeno (Tabela 2.3) é C₁₃H₁₈O₂, peso molar de 206,27 g mol⁻¹, constante de dissociação pK_a = 4,91 e coeficiente de partição octanol/água log Kow de 3,97, o que confirma a hidrofobicidade e elevada mobilidade em meio aquoso (CONKIE et al., 2012). Ele é insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol, acetona, metanol e clorofórmio.

Tabela 2.3. Estrutura molecular do ibuprofeno

Fórmula molecular	Estrutura molecular
C ₁₃ H ₁₈ O ₂	

O ibuprofeno é formado por um carbono quiral com misturas racêmicas de R- (-) – IB e S – (+) – IB, com efeitos farmacológicos potentes e com degradação lenta (ALI et al., 2009). Segundo Buser et al., (1999), na ETE, o ibuprofeno passa por transformações de oxidação e inversão do carbono quiral o que leva à formação dos principais metabólitos: hidroxi-ibuprofeno(OH-IBU), carboxi-ibuprofeno (CA-Ibu) e carboxi-ácido-hidratrópico (CA-HA), conforme Figura 2.3.

Figura 2.3. Principais metabólitos do ibuprofeno.



Fonte: (ZWIENER; FRIMMEL, 2003)

Ibu= Ibuprofeno, OH-Ibu= Hidroxi-ibuprofeno, CA-Ibu= carboxi-ibuprofeno, CA-HA= carboxi-ácido-hidratrópico

2.2 Ocorrência ambiental do diclofenaco e ibuprofeno

Em geral, as doses de DCF e IBU, quando ingeridas por seres humanos, são insolúveis no sistema gastrointestinal, sendo esta propriedade fator limitante de absorção, excretadas, então, pela urina e observada no esgoto sanitário em concentrações entre $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (SCHWEIGER et al., 2004).

O diclofenaco sob forma de comprimidos e de consumo oral é eliminado em período de 2 horas, após a ingestão. Dessa dosagem, 40% são, então, excretados pela urina, sendo que 6% estão sob sua forma inalterada, 16% como 4-hidroxi-diclofenaco e 18% como 5-

hidroxi-diclofenaco, 4,5-dihidroxi-diclofenaco, 3-hidroxi-4-metoxi-diclofenaco como metabólitos conjugados (SHEN et al., 1999; ZHANG; GEIBEN; GAL, 2008). Além disso, a aplicação dérmica desse fármaco pode resultar em maiores dosagens e em altas descargas nos ambientes aquáticos (RXLIST, 2006). Conforme uma revisão sistemática conduzida por Vieno e Sillanpää (2014), 6-7% do diclofenaco em gel é absorvido na pele, enquanto o restante é lavado da pele ou se prende à roupa.

Quanto à ocorrência do diclofenaco no ambiente aquático, Zhang, et al., (2008) detectaram concentrações de 10 ng L^{-1} em água potável e $380,7 \text{ ng g}^{-1}$ em lodo seco proveniente de sistemas de lodos ativados. Tauxe-Wuersch et al (2005) reportaram presença desse fármaco em $2,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em efluente de tratamento de esgoto sanitária na Suíça. Além dos efluentes líquidos, o diclofenaco foi detectado e quantificado em diferentes compartimentos ambientais, tais como em corpos hídricos superficiais e subterrâneos (Tabela 2.5 a 2.8).

Conforme a Diretiva 2013/39/EU, a Comissão da União Europeia incluiu o diclofenaco na lista dos principais poluentes orgânicos ocorrentes em águas superficiais em concentrações entre $0,7$ a $11 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Perez e Barcelona (2008) monitoraram o DCF e seu metabólito 4'-hidroxi-diclofenaco (4'-OH-DCF) em amostras de esgoto não tratadas e tratadas da estação de tratamento de esgoto em Rubi, Espanha. As concentrações médias de DCF e 4'-OH-DCF nas amostras sem tratamento foram $0,349$ e $0,237 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A partir do tratamento contínuo por lodos ativados em paralelo com biorreator de membrana (MBR), foi observada remoção de 26% para diclofenaco e 56% para o metabólito 4'-OH-DCF. No Brasil, observou-se para água do Rio das Velhas (Belo Horizonte/MG), Guandu (Rio de Janeiro/RJ) e Guarapiranga (São Paulo/SP) com $3,74$, $91,09$ e $4,56 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente (MIZUKAWA, 2016). Vale ressaltar que os cursos hídricos citados são importantes mananciais e conferem a sistemas de abastecimento de água de regiões densamente povoadas. Essas concentrações foram semelhantes às do monitoramento pioneiro, realizado em 1997, por Montagner et al., (2011) no Rio Paraíba (Rio de Janeiro/RJ) de 10 a 60 ng L^{-1} ; e por Roldan et al. (2010) de $87,7 \text{ ng L}^{-1}$ nos rios Atibaia (São Paulo) e Lobregat (Espanha). Quanto à ocorrência do ibuprofeno nos corpos hídricos, este fármaco é detectado em águas superficiais em concentrações entre $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a $17 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (KOLPING et al., 2002; THOMAS e HILTON, 2004; WEIGEL et al, 2004; SANTOS et al., 2013) e $3,3$ a $395 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em águas subterrâneas (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013). Dessa forma, há a necessidade de estudos relacionados à remoção destes micropoluentes no tratamento de efluentes.

Assim como o diclofenaco, o ibuprofeno também é detectado em esgoto doméstico, entretanto, este fármaco é encontrado em maiores concentrações. Além disso, o ibuprofeno não é altamente persistente e é mais susceptível à degradação nas ETE em comparação com o diclofenaco. Marchese et al (2003) verificaram 1,2 a 9,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno em efluentes de ETE na Itália. Alder et al (2006) observaram 1,8 a 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno em afluente da ETE de Galícia (Espanha). Américo et al (2012) observaram 2325,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em esgoto doméstico, 1993,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em afluente e 0,233 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em efluente de ETE situada em Três Lagoas/MS. Nas Tabela 2.9 a 2.12 estão incluídos os principais trabalhos relacionados à ocorrência do ibuprofeno em diferentes compartimentos ambientais.

As ocorrências e concentrações do diclofenaco e ibuprofeno podem ser relacionadas com a sazonalidade anual (PHUNG et al., 2017). Colaço et al. (2013) observaram maior concentração de diclofenaco no inverno em amostras de esgoto bruto e tratado em Curitiba/PR. Nessa estação climática tem-se declínio de temperatura e umidade, acarretando prejuízos na saúde humana, com o aumento de casos clínicos de gripes e alergias, e com isso, o elevado consumo de anti-inflamatórios. Ademais, no rio Monjolinho, São Carlos/SP, foram observadas maiores concentrações desses fármacos em período de seca, como resultado também da redução dos níveis de água, fluxo e da capacidade de diluição do corpo hídrico. Tal fato, foi semelhante ao observado por Montagner et al. (2011) ao analisar as bacias dos rios Jundiá e Piraí, São Paulo e Campinas. No entanto, Stelato et al. (2016) detectaram maiores concentrações de diclofenaco e ibuprofeno em períodos chuvosos nos córregos do Veado/Limoneiro em Presidente Prudente/SP. Conforme os autores, o aumento significativo dos níveis dos fármacos ocorreu em função do elevado escoamento pluvial e arraste de resíduos sólidos para os cursos hídricos, uma vez que, os rios estudados são urbanos e bastante susceptíveis às atividades antrópicas.

Quanto à ocorrência em esgoto sanitário, Fonseca et al. (2013) verificaram maior concentração de diclofenaco (0,165 $\mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno (0,358 $\mu\text{g L}^{-1}$) em efluentes em período de estiagem na cidade de Goiânia/GO. Além da influência sazonal e do índice pluviométrico, a ocorrência destes anti-inflamatórios nas amostras ambientais também é relacionada com a densidade urbana e com a atividade industrial na região. Nos municípios de São Paulo e Campinas, ambos grandes centros urbanos e industriais, foram notados 43% de frequência de detecção de DCF e 100% para IBU em todas as amostras de esgoto sanitário e de águas superficiais, sem efeito significativo da sazonalidade.

Yan et al. (2021) avaliaram a influência do consumo sazonal e espacial com a ocorrência de quatro medicamentos anti-inflamatórios (paracetamol, diclofenaco,

ibuprofenos e naproxeno) em duas estações de tratamento de esgoto sanitário localizadas respectivamente na porção oeste, com 626.000 habitantes, e sul, com 6.200 habitantes, em Guangzhou (China). Durante o período de amostragem de 375 dias, os autores constataram que não houve diferença significativa entre as estações para as concentrações de diclofenaco, no período do ano. Dessa forma, o DCF foi consumido constantemente com pouca oscilação sazonal. Em contrapartida, o consumo de ibuprofeno foi duas vezes maior no inverno, e conseqüentemente, a ocorrência desse anti-inflamatório foi elevada nas duas ETEs investigadas. Em relação à influência espacial, do afluente da ETE do menor município, porção sul, foi verificada maior concentração dos fármacos em relação ao afluente da cidade da porção oeste, no qual esse foi diluído em proporções dos efluentes industriais e maiores volumes de esgoto doméstico. Tais observações foram semelhantes aos estudos conduzidos por Jesus Gaffney et al. (2017) e por Lindqvist et al. (2005) que também avaliaram a influência das concentrações de DCF com a sazonalidade em Portugal, Finlândia e Tailândia. Segundo os autores citados e dos países analisados, a ocorrência do IBU em esgoto sanitário e em águas superficiais foi elevada significativamente no inverno, apenas em Portugal, não sendo constatada oscilação representativa deste fármaco na Finlândia e Tailândia.

Por serem moléculas hidrofóbicas, o DCF e IBU podem adsorver em solos, lodos e sedimentos. Biel-Maeso et al. (2021) constataram estes anti-inflamatórios em diferentes horizontes do solo em concentrações máximas de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, após a lavagem das colunas em testes de perfis em sorção e percolação de solos irrigados com fármacos. Segundo os autores, esses fármacos migraram com maior facilidade em colunas com menor teor de argila, principalmente pela capacidade de sorção das moléculas de carga negativa e pela hidrofobicidade. A partir desse estudo foi sugerido potencial de persistência e lixiviação como os principais efeitos do DCF e IBU no solo, conseqüentemente, contribuindo para a contaminação dos recursos hídricos subterrâneos em ambientes terrestres.

A interpretação da constante de partição octanol-água (K_{ow}) é realizada para a análise da hidrofobicidade das moléculas conforme Tabela 2.4. Esse coeficiente é adimensional e consiste na razão da concentração do soluto no solvente orgânico octanol e na água, tal parâmetro equivale à propensão ou à partição de sorção na matéria orgânica e no lodo, especificamente. Conforme este teste, as moléculas de diclofenaco e ibuprofeno tem constante $\log K_{ow}$ de 4,0 a 3,79, o que se pode inferir médio potencial de bioadsorção na matéria orgânica e em sedimentos. A partir disso, os efeitos adversos da sua ocorrência em diferentes matrizes podem ser desenvolvidos em longo prazo e sob formas secundárias.

No entanto, a capacidade de sorção dessas moléculas ao lodo também pode ser influenciada pela composição do inóculo, pH do meio e das interações eletrostáticas de grupos alifáticos e aromáticos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; LIN; TSAI, 2009; WEN et al., 2014).

Em geral, a maioria dos fármaco anti-inflamatórios tem mobilidade moderada baseado nas propriedades físico-químicas das moléculas e pelo coeficiente logarítmico de Kow. No entanto, as condições ambientais (potencial redox e a composição do lodo e sedimentos) são fatores fundamentais para a análise específica do comportamento de cada fármaco (JURADO; VÁZQUEZ-SUÑÉ; PUJADES, 2021).

Tabela 2.4. Interpretação da constante de partição octanol-água

Coefficiente K_{ow}	Interpretação analítica
$\log K_{ow} < 2,5$	baixo potencial de sorção;
$2,5 < \log K_{ow} < 4,0$	médio potencial de sorção;
$\log K_{ow} > 4,0$	alto potencial de sorção.

Além deste teste de caráter lipofílico, a associação entre o valor logaritmo do coeficiente Kow com a propriedade ácida da molécula permite relatar o acúmulo e presença preferencial na fase dissolvida ou adsorvida nos solos, lodo ou em sedimentos. Para o IBU, a propriedade ácida da molécula (pKa: 4,91) constante de Henry $1,50 \cdot 10^{-7}$ acoplado ao baixo coeficiente de partição octanol-água ($\log Kow: 3,9$) resulta na proposição de que este fármaco permanece preferencialmente na fase aquosa. Enquanto o diclofenaco, também com propriedade ácida com pKa referente a 4,15, constante de Henry a $4,73 \cdot 10^{-12}$ e LogKow de 4,51 com alto potencial de sorção, tende a acumular nos sedimentos. Américo-Pinheiro et al (2017) observaram a influência da temperatura na ocorrência do diclofenaco. Segundo os autores, o aumento da temperatura tende a reduzir a concentração do fármaco, favorecido pela incidência solar, a qual pode promover a fotodegradação.

Tabela 2.5. Ocorrência do diclofenaco em esgoto sanitário

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração máxima ($\mu\text{gDCF L}^{-1}$)	Referências
Esgoto sanitário	Reino Unido	9 pontos de amostragens na ETE Howdon	1,0	(ROBERTS; THOMAS, 2006)
	Reino Unido	ETE Coslech, Cilfynydd	1,2	(KASPRZYK-HORDERN et al., 2009)
	Espanha	Alcalá de Henares	0,561	(ROSAL et al., 2010)
	Coreia do Sul	Ulsan	0,243	(BEHERA et al., 2011)
	Brasil	Fortaleza/CE	5,60	(PAIVA; DE SOUZA et al., 2011)
	México	12 pontos afluentes em ETEs municipais	0,523	(SIM et al., 2011)
	Alemanha	Efluente sanitário após descarga em Rio Havel, Berlim	1,5	(SCHIMMELPFENNIG et al., 2012)
	Brasil	Belo Horizonte/MG	0,10	(QUEIROZ et al., 2012)
	Espanha	Astúrias	0,4	(FERNÁNDEZ et al., 2014)
	Brasil	Manaus/AM	0,785	(THOMAS et al., 2014)
	Brasil	São Carlos/SP	2,38	(CAMPANHA et al., 2015)
	Brasil	Jundiaí/SP	3,35	(CAMPANHA et al., 2015)
	Espanha	Girona	0,56	(GARCÍA-GALÁN et al., 2016)
	Brasil	Santos/SP	0,019	(PEREIRA et al., 2016a)
	Brasil	Três Lagoas/MS	8,25	(AMÉRICO-PINHEIRO et al., 2017)
	Brasil	Sumaré/SP	0,180	(PASQUINI, 2018)
	Brasil	Santa Maria/RS	$\leq 1,0$	(PIVETTA; DO CARMO CAUDURO GASTALDINI, 2019)
	Índia	ETE em Udaipur, sudeste do Rajastão	0,412	(WILLIAMS et al., 2019)
	Brasil	Araraquara/SP	2,12	(CORREIA et al., 2020)
	Brasil	Dracena/SP	17,0	(RAGASSI et al., 2020)

Tabela 2.6. Ocorrência do diclofenaco em águas superficiais.

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração máxima ($\mu\text{gDCF L}^{-1}$)	Referências
Águas superficiais	Alemanha	Lago Tegel, Berlim	0,435	(HEBERER; ADAM, 2004)
	Brasil	Represa Billings/SP	0,39	ALMEIDA e WEBER (2005)
	Alemanha	Rio Main, Schweinfurt	0,14	(LETZEL; METZNER; LETZEL, 2009)
	Brasil	Bacia Hidrográfica do Córrego da Onça, Três Lagoas/MS	82,50	AMÉRICO (2010)
	Brasil	Ribeirão Anhumas/SP	0,115	AMÉRICO (2010)
	Hungria	Rio Danúbio	0,931	(HELENKÁR et al., 2010)
	Espanha	Água de irrigação, Barcelona	0,60	(CALDERÓN-PRECIADO; MATAMOROS; BAYONA, 2011)
	Alemanha	Estuário do rio Elba	0,008	(LAANE et al., 2013)
	China	Lago Qingshan, zona leste	0,02	(ZHU; CHEN; LI, 2013)
	Espanha	Bacia hidrográfica do Rio Túria	3,50	(CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014)
	Argentina	Bacia hidrográfica do rio Suquia	$\leq 1,0$	(VALDÉS et al., 2014)
	China	Rio Huangpu, Shanghai, zona leste	0,03	(WEN et al., 2014)
	Brasil	Rio Monjolinho, São Carlos/SP	0,475	(CAMPANHA et al., 2015)

Tabela 2.7. Ocorrência do diclofenaco em águas superficiais (cont.).

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração máxima ($\mu\text{gDCF L}^{-1}$)	Referências
Águas superficiais	Grécia	Lago Pamvotis	0,457	(NANNOU; KOSMA; ALBANIS, 2015)
	França	Rio Doubs	0,166	(CHIFFRE et al., 2016)
	Brasil	Rio Iguaçu/PR	285	MIZUKAWA (2016)
	Brasil	Rio Atuba/PR	4,88	MIZUKAWA (2016)
	Brasil	Córrego do Veado/Limoeiro/SP	110,0	STELATO et al. (2016)
	China	11 pontos do estuário Jiulong	0,011	(SUN et al., 2016)
	China	Bacia hidrográfica do rio Beiyun	0,121	(MA et al., 2017)
	China	Rio urbano Guangzhou	0,645	(PENG et al., 2017)
	Brasil	Rio Jundiaí/SP	0,364	(DE SOUSA et al., 2018)
	Alemanha	Canal de Berlim	2,10	(SCHMIDT et al., 2018)

Tabela 2.8. Ocorrência do diclofenaco em águas subterrâneas, água potável e efluentes industriais.

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração máxima ($\mu\text{gDCF L}^{-1}$)	Referências
Águas subterrâneas	Canadá	Poços do Parque Nacional Point Pelee, Ontario	0,03	(CARRARA et al., 2008)
	Espanha	Llobregat delta, porção sul da Barcelona	0,477	(TEIJON et al., 2010)
	Costa Rica	5 aquíferos na Costa Rica	0,266	(SPONGBERG et al., 2011)
	Alemanha	Rastatt	0,129	(WOLF et al., 2012)
	Espanha	Porção noroeste da Espanha, 3 pontos dos aquíferos da área metropolitana de Barcelona	0,38	(LÓPEZ-SERNA et al., 2013)
	Suíça	Sistemas cársticos, Swiss Jura	0,40	(MORASCH, 2013)
	Estados Unidos	Massachusetts	0,7	(SCHAIDER et al., 2014)
	China	Aquíferos em Jiangnan Plain	0,7	(TONG et al., 2014)
	China	4 pontos de poços artesianos na porção central de Taiwan	0,14	(LU et al., 2016)
	Nova Zelândia	Waikato	1,0	(MOREAU et al., 2019)
Água Potável	Espanha	Área metropolitana de Barcelona	0,150	(JURADO et al., 2021)
	França	Canal Hérault	0,002	(TOGOLA; BUDZINSKI, 2008)
	Alemanha	Eslovênia	0,010	(SANTOS et al., 2010)
	França	Região Rhône-Alpes, zona sul	0,056	(VULLIET; CREN-OLIVÉ, 2011)
	Itália	Rio Tiber	0,021	(KRALCHEVSKA et al., 2013)
	Espanha	Bacia do Rio Turia, cidade de Valência	0,018	(CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014)
	Espanha	Água mineral na cidade de Valência	0,025	(CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014)
Efluente de hospitais	Noruega	Hospitais de Oslo	0,78 – 1,63	HILTON et al., (2007)
	China	4 hospitais em Taiwan	0,328 - 70	LIN; TSAI, (2009)
	Coreia	4 pontos de efluentes de hospitais na Coreia	6,880	SIM et al (2011)

Tabela 2.9. Ocorrência do ibuprofeno em esgoto sanitário.

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração máxima ($\mu\text{gIBU L}^{-1}$)	Referências
Esgoto sanitário	Finlândia	7 Estações de Tratamento de Esgoto sanitário	13,1	(LINDQVIST; TUHKANEN; KRONBERG, 2005)
	México	Emissor Central, Zona Urbana da Cidade do México	5,09	(GIBSON et al., 2007)
	Espanha	7 Estações de Tratamento de Esgoto sanitário do município de Seville	603	(SANTOS et al., 2009)
	Brasil	Sumaré/SP	0,18	(BELO; QUINÁIA; PLETSCHE, 2010)
	Brasil	Três Lagoas	0,23	(AMÉRICO et al., 2012)
	Canadá		45	(GUERRA et al., 2014)
	Brasil	São Carlos/SP	15,8	(CAMPANHA et al., 2015)
	França	ETE Sena Centro	0,951	(MAILLER et al., 2015)
	Espanha	ETE municipal de Leon	12,1	(HIJOSA-VALSERO et al., 2016)
	Brasil	Santos/SP	1,98	(PEREIRA et al., 2016a)
Espanha	ETE Castellón de la Plana	1,98	(BELLVER-DOMINGO; FUENTES; HERNÁNDEZ-SANCHO, 2017)	

Tabela 2.10. Ocorrência do ibuprofeno em esgoto sanitário (continuação).

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração	Referências
			máxima ($\mu\text{gIBU L}^{-1}$)	
Esgoto sanitário	África do Sul	ETE na província de KwaZulu-Natal	9,7	(MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017)
	República Tchéquia	Afluente do sistema de Wetlands na estação de tratamento de esgoto doméstico	36,4	(DVOŘÁKOVÁ BŘEZINOVA et al., 2018)
	Tunísia	4 ETES no norte da Tunísia	43,22	(KHAZRI et al., 2019)
				(PIVETTA; DO CARMO
	Brasil	Santa Maria/RS	0,51	CAUDURO GASTALDINI, 2019)
	China	Bacia do Rio das Pérolas	1,417	(ZHU et al., 2020)
	China	Guangzhou	0,324	(YAN et al., 2021)

Tabela 2.11. Ocorrência do ibuprofeno em águas superficiais.

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração máxima ($\mu\text{gIBU L}^{-1}$)	Referência
Águas superficiais	Japão	Tóquio	1,13	(NAKADA et al., 2006)
	Coréia do Sul	Rio Youngsan	0,038	(KIM et al., 2007)
	Reino Unido	Norte da Escócia	0,826	(NEBOT; GIBB; BOYD, 2007)
	Estados Unidos	Rio Mississipi, New Orleans/Louisiana	0,034	(ZHANG et al., 2007)
	Coréia do Sul	Rio Youngsan	0,038	(KIM et al., 2007)
	Brasil	Córrego da Onça, Três Lagoas/MS	34000	AMÉRICO (2010)
	China	3 rios ao norte da China	0,416	(WANG et al., 2010)
	Brasil	Rio Atibaia/SP	$\leq 0,02$	(MONTAGNER; JARDIM, 2011)
	Brasil	Rio Pirai/SP	0,06	(DE SOUSA et al., 2014)
	Brasil	Rio Jundiá/SP	0,74	(DE SOUSA et al., 2014)
	Brasil	Rio Doce/MG	0,016	(RODRIGUES et al., 2014)
	Brasil	Rio Negro/AM	0,5	(THOMAS et al., 2014b)
	Brasil	Rio Monjolinho, São Carlos/SP	0,744	(CAMPANHA et al., 2015)
	Brasil	Rio Atuba/PR	9,72	MIZUKAWA (2016)
	Brasil	Rio Palmital/PR	5,90	MIZUKAWA (2016)
	Brasil	Rio Belém/PR	9,87	MIZUKAWA (2016)
	Brasil	Baía de Todos-os-Santos e costa norte de Salvador/BA	1,8	(PEREIRA et al., 2016a)
	Brasil	Santos/SP	1,827	(PEREIRA et al., 2016b)
	Brasil	Córrego do Veado/Limoeiro/SP	42000	(STELATO et al., 2016)
	Brasil	Córrego do Cedro/Limoeiro/SP	14000	(STELATO et al., 2016)

Tabela 2.12. Ocorrência do ibuprofeno em águas subterrâneas, água potável e efluentes industriais.

Amostra ambiental	País	Localização	Concentração máxima ($\mu\text{gIBU L}^{-1}$)	Referência
Águas subterrâneas	China	Taiwan	1,11	LIN; TSAI, (2009)
	Costa Rica	5 aquíferos na Costa Rica	37,00	(SPONGBERG et al., 2011)
	Brasil	Lodo primário em ETEJapai	2206 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	MARTÍN et al., (2012)
	Vietnã	Hanoi	19,2	(TRAN; URASE; TA, 2014)
	Brasil	Aquífero Dunas-Barreiras, Natal/RN	0,1	(SILVA, 2015)
	Japão	-	0,012	(SIMAZAKI et al., 2015)
Sedimentos marinhos	Brasil	Litoral de São Sebastião/SP	1,0 ng g^{-1}	PUSCEDDU, (2016)
	Brasil	Emissário na Baía de Santos/SP	49 ng g^{-1}	PUSCEDDU, (2016)
	Paquistão	Dosaco Chowk	836,0	(ASHFAQ et al., 2017)
Água Potável	Arábia Saudita	Província de Jizan	0,02	(AL-RAJAB et al., 2018)
	Nova Zelândia	Waikato	1,0	(MOREAU et al., 2019)
	Brasil	Santa Maria/RS	0,645	(STARLING; AMORIM; LEÃO, 2019)
	Ásia	Sudeste asiático	0,085	(HASHIM et al., 2021)
	Nigéria	Barragem Usum, Abuja	0,054	(ILECHUKWU et al., 2021)
	Espanha	Barcelona	0,080	(JURADO; VÁZQUEZ-SUÑÉ; PUJADES, 2021)
Efluente de hospital	Espanha	Aquífero urbano na área metropolitana de Barcelona	0,100	(JURADO; VÁZQUEZ-SUÑÉ; PUJADES, 2021)
	Espanha	Aquífero vulcânico na Ilha Gran Canaria	0,060	(MONTESDEOCA-ESPONDA et al., 2021)
	Canadá	Quebec	$\leq 0,02$	(PULICHARLA et al., 2021)
Água residuária de indústria farmacêutica	Itália	-	0,03	(VALBONESI et al., 2021)

2.3 Ecotoxicidade do diclofenaco e ibuprofeno

Os fármacos são sintetizados para serem persistentes nos organismos e com princípios ativos que interfiram no metabolismo enzimático das células à baixas concentrações. Neste sentido, a persistência e a exposição crônica a esses aceptores químicos podem conduzir efeitos ecotoxicológicos em organismos não-alvos. Dessa forma, estudos relacionados com a ocorrência e com possíveis efeitos sinérgicos à organismos vivos são fundamentais para mitigação, controle na gestão ambiental e da saúde pública, além de assegurar a gestão sustentável dos recursos hídricos e saneamento ambiental (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; MOLINA et al., 2020; TISCA et al., 2021).

As preocupações quanto à ocorrência dos anti-inflamatórios no ambiente emergiram a partir de estudos ecotoxicológicos em diferentes compartimentos ambientais e em organismos vivos. Dentre os impactos gerados pela presença do diclofenaco e ibuprofeno no meio aquático, destaca-se a alteração fisiológica e metabólica das espécies em diferentes níveis tróficos, oferecendo ameaça para a estabilidade microbiana e para o ecossistema aquático (Tabelas 2.14 a 2.19)

Em relação aos testes ecotoxicológicos, a concentração do fármaco que induz metade do efeito tóxico máximo, observado em uma determinada espécie, é expressa em grau de toxicidade EC_{50} (*Effective Concentration*). Em relação a essa avaliação, observaram-se níveis de toxicidade aguda de 11,45 mg L⁻¹ de diclofenaco para *Vibrio fisheri* EC_{50} , e 22,43 mg L⁻¹ para *Daphnia magna* (CLEUVERS, 2004). Além disso, foram constatadas alterações citológicas renais e nas brânquias de peixes trutas arco-íris para 5,0 µg L⁻¹ em testes histopatológicos e toxicidade crônica em *Ceriodaphnia dubia* e em peixes zebra para 1,0 mg L⁻¹ e 4,0 mg L⁻¹, respectivamente, com exposição de 28 dias (SCHWAIGER et al., 2004)

Ferrari et al. (2003) observaram níveis de toxicidade aguda em bactérias, microcrustáceos, peixes e algas para 11,45 µg L⁻¹ de diclofenaco durante 30 minutos. Além disso, os autores detectaram níveis de toxicidade crônica em rotíferos *Brachionus calyciflorus*, após 48 horas de exposição com 246 µg L⁻¹ de diclofenaco.

Gravel et al. (2007) observaram inibição de proteínas do sistema imunológico em trutas a partir de 1,0 µg L⁻¹. Heckmann et al. (2007) obtiveram toxicidade aguda do ibuprofeno em *Daphnia Magna* a 80 mg L⁻¹ durante 48 horas. Os autores observaram redução da taxa de crescimento e da reprodução desta espécie na presença desse fármaco.

Mendes et al (2010) verificaram efeitos agudos em *Daphnia similis* a EC₅₀, em 48h para 43 mg L⁻¹ de diclofenaco. De forma semelhante, Alves (2003) observou níveis de toxicidade aguda e de imobilização da metade da população (EC₅₀) da *Daphnia mangna* para 224,30 µg L⁻¹, em 30 minutos de exposição. Santos et al (2010) constataram níveis de toxicidade aguda para *Dunaliella Tertiolecta* a partir de 185,69 µg L⁻¹, após 96 horas. Parolini et al. (2011) não verificaram efeitos significativos na fragmentação do DNA em hemócitos de mexilhões zebra (*Dreissena polymorpha*) expostos por 96 horas a 2,0 µg L⁻¹. Contudo, para 8,0 µg L⁻¹ foram constatados danos celulares e genéticos. Em relação aos moluscos *Ruditapes philippinarum* apresentaram incapacidade de suportar com o estresse oxidativo quando expostos por períodos de 1 a 7 dias em 0,1 e 1000,0 µg L⁻¹ de ibuprofeno (MILAN et al., 2013).

Figueiredo et al (2014) observaram maior sensibilidade da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* do que em *Chlorella vulgaris* a partir de 4,0 a 33,3 mg L⁻¹. Ademais, foi obtido 80% de inibição no crescimento da alga a 33,3 mg L⁻¹, e 10% para *Chlorella vulgaris* em 35 mg L⁻¹. Os autores observaram níveis de toxicidade aguda de 11,39 mg L⁻¹ para *Pseudokirchneriella subcapitata* EC₅₀, e 12,88 mg L⁻¹ para *Chlorella vulgaris* EC₁₀ (efeito de toxicidade em 10% da população analisada).

Moléculas lipofílicas, incluindo DCF e IBU, podem se adsorver aos ácidos graxos e às proteínas citoplasmáticas das células bacterianas e nos polissacarídeos estruturais dos biofilmes através das interações hidrofóbicas (TISCA et al., 2021). Ademais, o metabolismo bacteriano é conduzido por nutrientes e é susceptível à alterações na presença de micropoluentes orgânicos. Feng et al. (2018) observaram notável redução na diversidade bacteriana com a exposição de uma mistura de antibióticos, além da resistência como principal efeito sinérgico na produção primária do biofilme. Assim como Rosi-Marshall et al. (2013) observaram 50% de redução da diversidade microbiana em biofilmes na presença de anti-inflamatórios. Especificamente, os gêneros bacterianos que foram mais sensíveis a esses efeitos deletérios foram *Pseudomonas* e *Flavobacterium*. Outros ensaios ecotoxicológicos em diferentes fontes de inóculos estão denotados nas Tabelas 2.18 e 2.19.

Ericson et al. (2010) observaram potencial de bioacumulação do ibuprofeno em mexilhões azuis do Mar Báltico (*Mytilus edulis trossulus*). Estes organismos tiveram crescimento prejudicado na presença do fármaco durante os ensaios de ecotoxicidade. Quanto aos eucariotos, Matozzo et al. (2014) observaram que a exposição ao ibuprofeno de *Botryllus schlosseri* foi responsável pela redução da estabilidade das membranas lipossômicas e redução da quantidade de grupos fagócitos enzimáticos.

Outro parâmetro de avaliação ecotoxicológica nos compartimentos ambientais é a Avaliação de Risco Ecológico (PNEC) calculada com base no coeficiente de risco (HQ) que consiste em média geométrica da razão entre a concentração do fármaco prevista no ambiente com a concentração que não causaria efeito (CENO) (COOPER; SIEWICKI; PHILLIPS, 2008). O valor do coeficiente de risco pode ser enquadrado em 4 classificações (Tabela 2.) as quais representam as condições toxicológicas de cada composto alvo no ambiente.

A partir dessa avaliação de risco (Tabela 2.13), Zhu et al., 2020 classificaram o ibuprofeno como composto de alto risco ($HQ > 10$) quanto aos efeitos de alterações bioquímicas em células bacterianas, algas e peixes. Além de risco moderado para alterações celulares, alterações no crescimento e indução da mortalidade de crustáceos e peixes em estudo de caso no rio Pearl (China). O diclofenaco foi classificado como de alto risco na alteração reprodutiva em crustáceos e como risco moderado quanto aos efeitos de comportamento, estrutura celular e mortalidade em peixes.

Tabela 2.13. Classificação ecotoxicológica conforme o coeficiente HQ

Valor do HQ	Classificação ecotoxicológica
$< 0,1$	Não há risco
$0,1 \leq HQ < 1,0$	Baixo risco
$1,0 \leq HQ < 10$	Risco moderado
$HQ > 10$	Alto risco

Fonte: (YAN et al., 2015)

Vergili et al. (2019) elencaram o diclofenaco como de alto risco de causar efeitos adversos à comunidade aquática a partir de $43,0 \mu\text{g L}^{-1}$ com HQ correspondente a 215 em estações de tratamento de esgoto sanitário localizadas na Alemanha e Turquia. No entanto, Nantaba et al. (2020) obtiveram HQ inferior ao autor supracitado, o qual foi equivalente a 3,2 para diclofenaco e 0,39 para ibuprofeno, representando em risco moderado e baixo, respectivamente para cada composto. Tal estudo foi conduzido no lago Victoria (Uganda) em doses de $0,16 \mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $0,78 \mu\text{gIBU L}^{-1}$, com concentrações preditas a não causar impactos (CENO) de $0,05$ e $2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 2.14. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste.

Grupo	Espécie	Efeito	Dose	Classificação ecotoxicológica		Referência
				DCF	IBU	
Crustáceo	<i>Moina macrocopa</i>	Deficiência de crescimento (10 d)	2,0 - 32 mg L ⁻¹	Níveis de toxicidade crônica	-	(GAMA-FLORES; et al, 2006)
		Redução da capacidade reprodutiva;	1,13 – 72,0 mgIBU L ⁻¹	-	LC ₅₀ em 48h	(HAN et al., 2010)
		Imobilização;			51,4 mg L ⁻¹	
	Efeitos crônicos na sobrevivência			CENO 1,23 mg L ⁻¹ por 21d		
	Imobilização (48h)	77,5 – 101,5 mg L ⁻¹	Níveis de toxicidade aguda	-	(GÓMEZ-OLIVÁN et al., 2014)	
	Redução da capacidade reprodutiva;	0,50 – 40,5 mg L ⁻¹	LC ₅₀ em 24h	LC ₅₀ em 24h	(DU et al., 2016)	
	Deficiência de crescimento.		82,3 ± 1,91mg L ⁻¹	116 ± 2,07 mg L ⁻¹		
	<i>Daphnia magna</i>	Redução da capacidade reprodutiva (21 d);	5 – 5000 µg L ⁻¹	Níveis de toxicidade crônica	-	(LIU et al., 2017)
		Deficiência de crescimento (48 h); Alteração do DNA.				
		Deficiência de crescimento e na capacidade reprodutiva;	12,5 – 200 mg L ⁻¹	Níveis de toxicidade aguda	-	(WOERMANN; SURES, 2020)
Letalidade a partir de 17 mg L ⁻¹	EC ₅₀ 53 mg L ⁻¹ após 48h EC ₁₀ em 0,8 mg L ⁻¹ na capacidade de reprodução					

Tabela 2.15. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste. (cont.)

Grupo	Espécie	Efeito	Dose	Classificação ecotoxicológica	Referência
Cnidário	<i>Hydra vulgaris</i>	Deficiência morfológica	0,01 – 10 mg L ⁻¹	Níveis de toxicidade aguda EC ₅₀ 8,0 mg L ⁻¹	- (PASCOE; KARNTANUT; MÜLLER, 2003)
	<i>Hydra attenuata</i>	Deficiência morfológica células.	das 1,2 – 0,21 µgIBU L ⁻¹	-	Níveis de toxicidade aguda LC ₅₀ 22,3 mg L ⁻¹ (96h) EC ₅₀ 1,18 mg L ⁻¹ (96h) (QUINN; GAGNÉ; BLAISE, 2008)
Rotíferos	<i>Platonus patulus</i>	Redução do crescimento (25 d)	do 2,0 – 32,0 mg L ⁻¹	Níveis de toxicidade crônica	- (GAMA-FLORES; SARMA; NANDINI, 2006)
Molusco	<i>Dreissena polymorpha</i>	Alteração do DNA	30 – 450 µg L ⁻¹	Toxicidade crônica	- (PAROLINI et al., 2009)
	<i>P. carinatus</i>	Inibição de crescimento; Deficiência da capacidade reprodutiva.	de 0,05 – 10 µg L ⁻¹	1,02 µg L ⁻¹ 2,43 µg L ⁻¹ 5,36 µg L ⁻¹ (CENO)	- (SANTOS et al., 2010)
	<i>Corbicula fluminea</i>	Alteração do DNA; Genotoxicidade	da 0,1 – 50 µg L ⁻¹	Níveis de toxicidade crônica	- (AGUIRRE-MARTÍNEZ; et al, 2015)

Tabela 2.16. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste. (cont.)

Grupo	Espécie	Efeito	Dose	Classificação ecotoxicológica		Referência	
				DCF	IBU		
Peixe	<i>Pimephales notatus</i>	Alterações morfológicas nas guelras a partir de 4 dias; Redução dos níveis de prostaglandina nas brânquias.	5,0 – 100 $\mu\text{gIBU L}^{-1}$	-		Baixo potencial de bioacumulação	(BHANDARI; VENABLES, 2011)
	<i>Danio rerio</i>	Lesões no tecido cardiovascular; Inibição das contrações musculares (56 h); Deficiência da capacidade reprodutiva.	0,9 – 22 $\mu\text{g L}^{-1}$	Redução dos batimentos cardíacos a partir de 24,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ após 56h		Redução da densidade celular a partir de 4,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ após 50h	(ZHANG et al., 2011)
	<i>Rhamdia quelen</i>	Alterações hematológicas e enzimáticas renais por 96h.	0,2 – 20 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$	Toxicidade aguda nos rins e no DNA a 20 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$		-	(GHELFI et al., 2015)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Alterações na histologia de guelras; Alterações no crescimento; Desregulador endócrino.	0,1 – 1,0 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$	Toxicidade crônica CENO > 320 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$		-	(GRÖNER et al., 2017)
	<i>Oryzias latipes</i>	Deficiência da capacidade reprodutiva; Atraso na eclosão de ovos.	1,13 – 72,0 mgIBU L^{-1}		-	Toxicidade crônica em 120 dias; CENO 1,0 $\mu\text{gIBU L}^{-1}$	(HAN et al., 2017)
	<i>Oryzias latipes</i>	Redução da fertilidade e fecundidade; Alteração da estrutura óssea no maxilar.	7,1 – 78 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$	Toxicidade média a 78 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$ por 14 dias		-	(YOKOTA et al., 2017)

Tabela 2.17 Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em organismos teste. (cont.)

Grupo	Espécie	Efeito	Dose	Classificação ecotoxicológica		Referência
				DCF	IBU	
Peixe	<i>Oryzias latipes</i>	Deficiência da capacidade reprodutiva; Atraso na eclosão de ovos.	1,13 – 72,0 mgIBU L ⁻¹	-	Toxicidade crônica em 120 dias; CENO 1,0 µgIBU L ⁻¹	(HAN et al., 2017)
		Redução da fertilidade e fecundidade; Alteração da estrutura óssea no maxilar.	7,1 – 78 µgDCF L ⁻¹	Toxicidade média a 78 µgDCF L ⁻¹ por 14 dias	-	(YOKOTA et al., 2017)
	<i>Pimephales notatus</i>	Alterações morfológicas nas guelras a partir de 4 dias;	5,0 – 100 µgIBU L ⁻¹	-	Baixo potencial de bioacumulação	(BHANDARI; VENABLES, 2017)
		Redução dos níveis de prostaglandina nas brânquias.				
	<i>Rhamdia quelen</i>	Alterações hematológicas e enzimáticas renais por 96h.	0,2 – 20 µgDCF L ⁻¹	Toxicidade aguda nos rins e no DNA a 20 µgDCF L ⁻¹	-	(GHELFI et al., 2017)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Alterações na histologia de guelras;	0,1 – 1,0 µgDCF L ⁻¹	Toxicidade crônica CENO > 320 µgDCF L ⁻¹	-	(GRÖNER et al., 2017)
		Alterações no crescimento; Desregulador endócrino.				
	<i>Danio rerio</i>	Lesões no tecido cardiovascular; Inibição das contrações musculares (56 h); Deficiência da capacidade reprodutiva.	0,9 – 22 µg L ⁻¹	Redução dos batimentos cardíacos a partir de 24,1 µg L ⁻¹ após 56h	Redução da densidade celular a partir de 4,3 µg L ⁻¹ após 50h	(ZHANG et al., 2020)

Tabela 2.18 Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em diferentes fontes de inóculos.

Fonte de inóculo	Efeito	Dose	Referência
Reator anaeróbio alimentado com meio sintético	Inibição de 50% do potencial metanogênico a partir de 120 mgDCF L ⁻¹ ; Alteração metabólica na síntese de DNA em <i>archaeas</i> metanogênicas.	10 – 400 mgDCF L ⁻¹	(FOUNTOULAKIS; STAMATELATOU; LYBERATOS, 2008)
Reator lodos ativados alimentado com esgoto sanitário	Alteração contínua no potencial desnitrificante em 30%; Não houve toxicidade aguda no inóculo	0 – 200 µg DCF L ⁻¹	(OZDEMIR et al., 2015)
Reator anaeróbio alimentado com esgoto sanitário	Inibição de 30% do potencial metanogênico a partir de 546 mgDCF L ⁻¹ ;	100 – 3000 mgDCF L ⁻¹	(SYMSARIS et al., 2015)
Reator aeróbio alimentado com esgoto sanitário	Alteração da parede celular microbiana; Aumento da diversidade microbiana; Redução do potencial desnitrificante do inóculo.	5,0 µg L ⁻¹ (IBU + DCF)	(JIANG et al., 2017)
Reator anaeróbio alimentado com esgoto sanitário	Não houve alteração do potencial desnitrificante; Alteração aguda no potencial metanogênico do inóculo.	10 µg DCF L ⁻¹ 10 µg IBU L ⁻¹	(ARIAS et al., 2018)
Reator de lodos ativados alimentado com esgoto sanitário	Inibição de 24% do potencial metanogênico a partir de 0,7 mgDCF L ⁻¹ ; Acúmulo de ácidos orgânicos, principalmente com o aumento da produção de ácido acético.	0,035 – 0,7 mgDCF L ⁻¹	(HU et al., 2018)

Tabela 2.19. Efeitos do ibuprofeno e diclofenaco em diferentes fontes de inóculos (cont.).

Fonte de inóculo	Efeito	Dose	Referência
Sedimentos de rio	Aumento da abundância relativa de microrganismos no biofilme a $100 \mu\text{g L}^{-1}$	$10 - 100 \mu\text{g DCF L}^{-1}$	(LAWRENCE et al., 2007)
Reator aeróbio utilizado no tratamento de esgoto sanitário em parques de recreação	Inibição de 50% na biomassa a partir de $1000 \mu\text{g IBU L}^{-1}$	$300 - 1000 \mu\text{g IBU L}^{-1}$	(LONDOÑO; PEÑUELA, 2015)
Reator lodos ativados alimentado com esgoto sanitário	Inibição de 50% do potencial de nitrificação do inóculo a partir de $250 \text{ mg IBU L}^{-1}$; Redução de 80% da taxa específica de redução da amônia; Redução de 60% da taxa específica de absorção do fósforo.	$10 - 500 \text{ mg IBU L}^{-1}$	(KATSOU et al., 2016)
Consórcio fúngico <i>A. Niger</i> + <i>M. circinelloides</i> + <i>T. longibrachiatum</i> + <i>T. polyzona</i> + <i>R. microsporus</i> nome completo dos organismos	Redução da capacidade de crescimento (fase lag) e na morfologia granular.	$1,0 \text{ mg L}^{-1}$ DCF + IBU	(KASONGA et al., 2019)
Cepas de <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> quando coloca a primeira vez no texto tem que escrever o nome completo da bactéria	Inibição da <i>E. coli</i> em $48,82 \mu\text{g mL}^{-1}$ e <i>B. subtilis</i> a $31,55 \mu\text{g mL}^{-1}$	$10 - 50 \mu\text{g DCF mL}^{-1}$	(VISHNU PRIYAN et al., 2021)
Reator lodos ativados alimentado com meio sintético	Redução dos potenciais nitrificante e desnitrificante do inóculo; Inibição da remoção de nitrogênio em 22%.	$10 - 30 \text{ mg IBU L}^{-1}$	(KANAFIN et al., 2021)

2.4 Degradação do diclofenaco e ibuprofeno

As estruturas parciais e parentais dos fármacos podem reagir ou adsorver com outros compostos orgânicos e coloides, afetando diretamente a atividade biológica. Com isso, estudos relacionados às tecnologias de remoção e a otimização dos processos unitários são fundamentais.

No tratamento terciário das ETEs, as tecnologias de tratamento químico são amplamente aplicadas na remoção dos micropoluentes, incluindo métodos de oxidação como Fenton, ozonização, fotólise e processos oxidativos avançados (GARRIDO-CARDENAS et al., 2019; LEJEUNE; CHOUBERT, 2019). Contudo, os custos de operação e implantação de tais práticas são altos, além de não ser obtida remoção completa.

Clara et al. (2004) obtiveram 60% de remoção de diclofenaco (1080 mg DQO L⁻¹) em sistema de lodos ativados conjugado ao sistema de filtração por membranas com tempo de residência celular de 275 dias. Enquanto, Kreuzinger et al (2004) obtiveram a mesma eficiência para tempo de retenção celular de 300 dias, em reator aeróbio para a mesma concentração do fármaco. Assim, não foi observada correlação do tempo de assimilação do substrato com a eficiência de remoção do tóxico.

Urase e Kikuta (2005) obtiveram maior remoção (66%) de diclofenaco de sódio (x mg/L) em reatores sequenciais contínuos facultativos em pH 4,4. Neste estudo, os autores constataram que esta condição ácida pode ter favorecido a degradação do diclofenaco por meio da clivagem dos conjugados de glucoronídeo; além disso, observarem 10% de adsorção na biomassa microbiana.

Quintana e colaboradores (2005) avaliaram a remoção de cinco fármacos (ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e bezafibrato) solubilizados em metanol em reatores em batelada com inóculo proveniente de lodos ativados e substrato sintético em condições aeróbias. Sob tais condições, não foi observada remoção do diclofenaco e 96% de remoção de ibuprofeno (20 mg L⁻¹). Nas condições com ibuprofeno foi observado dois isômeros de hidroxibuprofeno como intermediários da mineralização. Segundo os autores, a remoção do ibuprofeno só foi efetiva mediante o cometabolismo, com a suplementação de fonte adicional de carbono e energia para o consórcio microbiano na forma de metanol (100 mg L⁻¹).

Estudos relacionados à remoção biológica dos fármacos são apresentados nas Tabelas 2.20 a 2.24. Em diferentes trabalhos foram retratados a eficácia do tratamento de lodos ativados para a remoção dos micropoluentes. Tal sistema é considerado

convencional, enquanto biorreatores de membranas estão incluídos no tratamento não convencional.

Radjenovic et al (2009) avaliaram sistema convencional de lodos ativados e de membranas submersas para a remoção do diclofenaco de sódio e ibuprofeno em ETE de Barcelona (Espanha). O TDH para ambos os testes foi de 12 horas e tempo de residência celular de 10 dias, com efluente de indústria farmacêutica e têxtil, em conjunto com esgoto doméstico. Neste estudo, foi observada 22% e 99% de degradação do diclofenaco de sódio e ibuprofeno em lodos ativados; e de 65% e 99% em sistemas e membranas, para 1,6 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ afluente, respectivamente.

Matamoros; Salvadó (2012) avaliaram a eficiência de remoção de 25 micropoluentes em 4 estações de tratamento de esgoto sanitário por sistemas convencionais (lodos ativados, decantadores) e não convencionais (*wetlands* construídos, reatores biológicos rotativos). Nesse trabalho, os autores observaram na *wetlands* menor eficiência de remoção, em relação as demais tecnologias avaliadas. Ademais, a remoção da cafeína, ibuprofeno e triclosan foi 1,3; 8,9 e 2,4 vezes superior, respectivamente, ao tratamento convencional, devido à condição redox; sendo observado para o ibuprofeno e cafeína maior remoção nas condições aeróbias (VERLICCHI; AL AUKIDY; ZAMBELLO, 2012).

Qiang et al., (2013) obtiveram a remoção de seis micropoluentes em 20 ETEs rurais, sendo comparado diferentes processos de tratamento, a saber: Lodos ativados, *Wetlands* construídas, tanques sépticos e reatores de leito móvel. Nos sistemas de lodos ativados foram obtidos desempenho superior às demais configurações, com remoção acima de 70% para todos os fármacos afluente.

Neste sentido, Aquino et al (2013) avaliaram a remoção do diclofenaco em *wetlands* projetadas para nitrificação e obtiveram 93% para 0,5 mg L^{-1} inicial. Segundo os autores, a fotodegradação e condições facultativas foram fundamentais para a sua eficiência de remoção.

Ahmed et al. (2017) analisaram a remoção de micropoluentes orgânicos através de uma revisão sistemática com abordagem da degradação química, biológica e híbrida em efluentes de ETEs. Na comparação dessas tecnologias de remoção, os autores elencaram a degradação como a melhor possibilidade de remoção de hormônios e anti-inflamatórios, especificamente em processos de lodos ativados.

Granatto et al. (2020) obtiveram $28,24 \pm 1,1\%$ e $18,72 \pm 1,6\%$ de degradação de diclofenaco e ibuprofeno a partir de $43,2 \pm 0,01 \text{ mgDCF L}^{-1}$ e $43,42 \pm 0,03 \text{ mgIBU L}^{-1}$ em reatores em batelada operados em condições metanogênicas. Conforme os autores, os

reatores foram inoculados com etanol como co-substrato (200 mg L^{-1}) e esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos (Brasil). Sob tais condições, o etanol favoreceu a produção de metano e remoção dos fármacos, pelo favorecimento do cometabolismo.

Em outro estudo sobre a metanogênese e remoção de compostos recalcitrantes, Granatto et al. (2021a) avaliaram a remoção de triclosan ($15,5 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e propranolol ($55,9 \pm 1,2 \text{ mg L}^{-1}$) em reatores em bateladas alimentados com etanol (200 mg L^{-1} de matéria orgânica). Os autores relataram maior degradação do triclosan de $77,1 \pm 0,1\%$ com etanol como co-substrato (200 mg L^{-1}) e máxima remoção do propranolol de $88,4 \pm 0,9\%$ na condição sem etanol.

Granatto et al. (2021b) avaliaram a remoção do diclofenaco ($106 \pm 32 \mu\text{g L}^{-1}$), ibuprofeno ($166 \pm 55 \mu\text{g L}^{-1}$), ambos anti-inflamatórios, propranolol (201 ± 113 - $250 \pm 141 \mu\text{g L}^{-1}$) como um fármaco betabloqueador e triclosan ($185 \pm 148 \mu\text{g L}^{-1}$) como um composto antiséptico em reator EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*), escala aumentada (69 L), alimentado com esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP (Brasil) e 200 mg L^{-1} de etanol como co-substrato em TDH de $36 \pm 4\text{h}$ e $20 \pm 2\text{h}$. Segundo os autores, a diminuição do TDH de $36 \pm 4\text{h}$ para $20 \pm 2\text{h}$ não influenciou a remoção dos fármacos, todavia, o etanol contribuiu para máxima remoção dos fármacos, sendo: 72% de degradação do triclosan, 42% de diclofenaco, 50% de ibuprofeno e 46% de propranolol. Dessa forma, destaca-se que o cometabolismo resultou na maior remoção de compostos de difícil degradação.

Tabela 2.20. Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais.

Reator	Aplicação	Substrato de Alimentação	Condições operacionais	Desempenho do sistema	Referências
Sistema integrado anóxico reator de membranas (MBR)	Remoção de fármacos, produtos de cuidado pessoal e hormônios	Meio sintético simulando esgoto sanitário. DQO aflu= $160 \pm 18 \text{ mg L}^{-1}$ $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ibuprofeno + diclofenaco $20 \text{ mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$	TDH = 24h pH = $7,25 \pm 0,75$ SST = $5,12 \text{ g L}^{-1}$	90% de remoção da carga nitrogenada (NT) Nitrificação e desnitrificação simultânea Não foi observada remoção de diclofenaco, enquanto 95% do ibuprofeno afluente foi removido	(PHAN et al., 2014)
Bateladas alimentadas sequenciais	Remoção de diclofenaco	Esgoto sanitário DQO inicial= 700 mg L^{-1} $10 \mu\text{g L}^{-1}$ diclofenaco $140 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$ Co-substrato: Glicose (300 mg L^{-1}) + extrato de levedura (15 mg L^{-1})	Inóculo proveniente de sistema de lodos ativados pH = $7,2 \pm 0,2$ SST = $4,4 \pm 2,5 \text{ g L}^{-1}$	15% de remoção do diclofenaco 30% de consumo de N_2O O diclofenaco não interferiu na produção de ácidos orgânicos	(OZDEMIR et al., 2015)
UASB + lodos ativados	Remoção de diclofenaco, ibuprofeno e nitrogênio total	Meio sintético simulando água residuária de laticínios. DQO aflu= $782 \pm 204 \text{ mg L}^{-1}$ $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ibuprofeno + diclofenaco $80,35 \text{ mgN L}^{-1}$ Co-substrato: Metano	Lodo granular com 30 gSST L^{-1} Volume total = 56 L COV = $680 \pm 190 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ TDH = $20 \pm 2 \text{ h}$ (UASB) + $9 \pm 1 \text{ h}$ (lodos ativados)	93% de remoção de matéria orgânica; 85% de remoção de metano 80% de remoção do ibuprofeno em condições anóxicas do sistema lodos ativados.	(ARIAS et al., 2018)

Tabela 2.21 Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).

Reator	Aplicação	Substrato de Alimentação	Condições operacionais	Desempenho do sistema	Referências
Leito empacotado RAHLF acoplado ao biorreator de membranas	Remoção da sulfametoxazol, diclofenaco e ibuprofeno	Meio sintético simulando esgoto sanitário DQO aflu= $350 \pm 20 \text{ mg L}^{-1}$ 0,1 mg L^{-1} ibuprofeno + diclofenaco + sulfametoxazol 20 $\text{mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ <u>Co-substrato:</u> Acetato de sódio e propionato	TDH = 3,1 – 16,8 h SST = 25 mg L^{-1}	96% de remoção de matéria orgânica 100% de remoção dos micropoluentes, principalmente a TDH 8,7 h	(LIM et al., 2019)
Lodos ativados	Remoção de diclofenaco e ibuprofeno	Esgoto sanitário 0,16 – 7,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ diclofenaco + ibuprofeno 140 $\text{mgNH}_4 \text{ L}^{-1}$	TDH = 9 h pH = 7,0 – 8,5 T = 16 – 17°C	90% de remoção de matéria orgânica 80% de remoção de NH_4 80% de remoção do diclofenaco e ibuprofeno	(CONTRERAS et al., 2019)
Reator de leito móvel	Remoção de diclofenaco e ibuprofeno	Esgoto sanitário DQO aflu= $260,0 \pm 8,0 \text{ mg L}^{-1}$ 0,1 mg L^{-1} ibuprofeno + diclofenaco + sulfametoxazol 2,6 $\text{mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ <u>Co-substrato:</u> Acetato de sódio	TDH = 48 h pH = 7,7 – 8,3	76% de remoção do ibuprofeno 44% de remoção do diclofenaco O acetato não contribuiu para o aumento da remoção do ibuprofeno	(LIANG et al., 2019)

Tabela 2.22. Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).

Reator	Aplicação	Substrato de Alimentação	Condições operacionais	Desempenho do sistema	Referências
Reator anaeróbio com biomassa redutora de sulfato (BRS)	degradação de ibuprofeno e diclofenaco por bactérias redutoras de sulfato	Meio sintético simulando esgoto sanitário 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno	Lodo granular SSV = $6,1 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$	7,0% de degradação e 12,4% de adsorção de diclofenaco 5,0% de degradação e 5,2% de adsorção de ibuprofeno	(JIA et al., 2019)
Bateladas sequenciais	Remoção da carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno	Meio sintético específico para desenvolvimento de fungos 0,2 - 10 $\text{gNO}_3 \text{ L}^{-1}$ <u>Co-substrato: Glicose</u> (10 g L^{-1})	pH = 3,0 – 4,6 C:N = 5:1	> 97 % de remoção da carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno; Ocorrência das reações catalisadoras por consórcios fúngicos de hidrólise, oxidação, hidroxilação e peroxidação. A aeração contribuiu para a hidrólise dos compostos aromáticos, enquanto a anaerobiose contribuiu para o coeficiente de partição com o aumento da solubilização dos fármacos.	(KASONGA et al., 2020a)
Reator anaeróbio mesofílico acoplado ao reator aeróbio termofílico	Remoção de fármacos em condições híbridas	Esgoto sanitário suplementado por 40 – 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fármacos	Inóculo proveniente do decantador primário de ETE municipal 260 L e 35°C (reator anaeróbio) + 40 L e 60°C (reator aeróbio) TDH = 19,6 h e 22,4 h	Maior remoção de cafeína (95%) e sulfametoxazol (90%); Não houve remoção do ibuprofeno, aumento de 4% da concentração de diclofenaco, através da formação dos glucoronídeos.	(GONZALEZ-SALGADO et al., 2020)

Tabela 2.23 Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).

Reator	Aplicação	Substrato de Alimentação	Condições operacionais	Desempenho do sistema	Referências
Bateladas	Degradação de diclofenaco e ibuprofeno em condições metanogênicas	Esgoto sanitário Etanol (200 mg L ⁻¹) + 43,20±0,01 mgDCF L ⁻¹ + 43,42±0,03 mgIBU L ⁻¹	Inóculo proveniente de reator UASB 200 mg L ⁻¹ de matéria orgânica	O etanol favoreceu a produção de metano e resultou na maior remoção de DCF (28,24±1,10%) e de IBU (18,72±1,60%)	(GRANATTO et al., 2020b)
Lodos ativados	Otimização energética; remoção de hormônios e anti-inflamatórios.	Esgoto sanitário 5,08 µg L ⁻¹ ibuprofeno + 1,92 µg L ⁻¹ diclofenaco	Volume = 15 L TDH = 0,5 h T = 20 ± 2°C	68 ± 8,5 de remoção de matéria orgânica 39% de remoção do diclofenaco 57% de remoção do ibuprofeno	(KOUMAKI et al., 2021)
Lodos ativados	Remoção de diclofenaco e ibuprofeno por microrganismos heterotróficos nitrificantes	Esgoto sanitário DQO aflu= 200 ± 8,0 mg L ⁻¹ 1,0 mg L ⁻¹ ibuprofeno + diclofenaco + sulfametoxazol 20 mgNH ₄ L ⁻¹ <u>Co-substrato:</u> Acetato de sódio	TDH = 1 – 2 h T = 22°C pH = 8,0 ± 0,5	5% de remoção de diclofenaco 20% de remoção do ibuprofeno A degradação do diclofenaco não foi influenciada pela atividade nitrificante, o contrário foi observado para a remoção do ibuprofeno; A composição afluente e o TDH são fatores determinantes na composição microbiana e capacidade de degradação de fármacos.	(GONZALEZ-GIL et al., 2021)

Tabela 2.24 Degradação de IBU e DCF em diferentes condições operacionais (cont.).

Reator	Aplicação	Substrato de Alimentação	Condições operacionais	Desempenho do sistema	Referências
Lodos ativados	Remoção de fármacos em condições aeróbias e atividade microbiana heterotrófica	Esgoto sanitário 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fármacos <u>Co-substrato:</u> Acetato de sódio (210 mg L^{-1}) + ácido acético (95 mg L^{-1}) Cloreto de amônio (40,0 mg L^{-1})	Inóculo proveniente de sistema de lodos ativados Volume = 5 L TDH = 10 h e 8 h T = 25° C COV = 0,2 – 0,8 gDQO $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$	Evidência do cometabolismo na degradação de fármacos; O TDH não interferiu significativamente na remoção dos poluentes;	(KENNES-VEIGA et al., 2021)
Bateladas	Degradação de triclosan e propranolol sob condições metanogênicas	Esgoto sanitário Etanol (200 mg L^{-1}) + 55,90±1,20 mg L^{-1} de propranolol + 5,10±0,10 mg L^{-1} de triclosan	Inóculo proveniente de reator UASB 200 mg L^{-1} de matéria orgânica	Maior remoção do triclosan (77,1±0,1%) com etanol (200 mg L^{-1}); e máxima degradação do propranolol (88,4±0,9%) sem o co-substrato orgânico.	(GRANATTO et al., 2021a)
EGSB	Remoção de DCF, IBU, PRO e TCS em reator de escala aumentada	Esgoto sanitário TDH = 36 a 20h diclofenaco (106±32 $\mu\text{g L}^{-1}$), ibuprofeno (166±55 $\mu\text{g L}^{-1}$), propranolol (201±113-250±141 $\mu\text{g L}^{-1}$) e triclosan (185±148 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Inóculo anaeróbico proveniente de UASB	O uso do etanol favoreceu a remoção cometabólica do TCS, DCF, IBU e PRO. Não houve diferença significativa das remoções dos fármacos para TDH de 36h e 20h.	(Granatto, et al. 2021)

2.5 Microrganismos envolvidos na degradação do diclofenaco e ibuprofeno

Na biorremediação, os fatores substrato, microrganismos e condição redox são fundamentais para a degradação de fármacos anti-inflamatórios (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2020). Segundo Show et al. (2021), a biorremediação consiste em uma alternativa promissora em relação às demais técnicas de degradação do composto. Neste processo metabólico, o diclofenaco e o ibuprofeno podem ser degradados em condições aeróbias, anóxicas e anaeróbias.

Na composição dos produtos de cuidado pessoal (PPCPs) estão incluídos compostos com anel aromático. Assim, os gêneros associados à degradação destes compostos são citados pela capacidade de realizar a clivagem e hidroxilação da cadeia aromática (CHAN et al., 2009; LIN et al., 2010; CHANG et al., 2014; ARIAS et al., 2018).

A molécula de diclofenaco é formada por dois anéis aromáticos ligados por uma porção anilina, além do grupo acetato e por dois grupos clorados. Enquanto, o ibuprofeno também é formado por um anel aromático ligado ao grupo ácido carboxílico. Dessa forma, ambos os micropoluentes de interesse são constituídos por cadeias aromáticas, mas se diferenciam quanto aos grupos ligantes.

Para ambas as moléculas, em função dos anéis aromáticos comprometem a biodisponibilidade e os torna recalcitrantes à degradação, sendo necessário o sinergismo metabólico. Tal processo corresponde à interação de diferentes microrganismos com variadas rotas metabólicas e metabolismos dos consórcios microbianos que podem servir de substratos para outras populações, favorecendo a degradação desses fármacos.

Por meio das análises de regiões conservadas do gene RNA ribossômico 16S é possível caracterizar a biomassa dos reatores aplicados na remoção de compostos recalcitrantes. A partir dessa técnica, torna-se possível a elucidação de hipóteses acerca das cooperações metabólicas a partir da abundância relativa e funções fisiológicas dos filos, gêneros ou espécies. Dessa forma, a identificação dos microrganismos nas etapas de degradação é de grande importância para a compreensão do sinergismo metabólico e para o controle e otimização dos processos.

Jiang et al. (2017) identificaram as populações de microrganismos em reatores operados em bateladas sequenciais aplicados na remoção de diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno. Os autores utilizaram inóculo proveniente de um tanque de aeração para tratamento de água residuária do município de Nanjing (China) e substrato sintético simulando esgoto sanitário com $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos fármacos. Por meio da aproximação

filogenética, foi constatado o aumento dos índices de diversidade microbiana com a adição dos anti-inflamatórios (diclofenaco e ibuprofeno) em relação às amostras controles. Ademais, pelo pirosequenciamento genético, foram identificados os filós Actinobacteria e Bacteroidetes com abundância relativa predominante nas condições de maior remoção dos fármacos, 39% e 45%, respectivamente. Representantes destes filós foram associados à capacidade de degradação dos compostos de interesse. Segundo os autores, os microrganismos pertencentes ao filo Bacteroidetes podem utilizar compostos orgânicos de elevado peso molecular, incluindo DCF e IBU, como fonte de carbono e energia. Tais observações foram também corroboradas por (DRURY; ROSI-MARSHALL; KELLY, 2013) que identificaram aumento da abundância relativa dos Bacteroidetes em estações de tratamento de efluentes localizadas em áreas altamente urbanizadas e com altos níveis de fármacos não esteroidais.

Além disso, espécies redutoras de nitrato, tais como *Pseudomonas* spp., podem usar o grupo anilina da molécula de DCF (MCLNERNEY, 2007), enquanto *Dechloromonas* spp. podem assimilar os anéis aromáticos da molécula de IBU e DCF como fonte de carbono e energia (COATES et al, 2001).

Bessa et al. (2017) isolaram *Brevibacterium* spp. do inóculo de lodos ativados, sendo verificado capacidade de assimilação parcial de diclofenaco (em torno de 35% a partir de 10 mgDCF L⁻¹) como única fonte de carbono. Nas condições em que houve a suplementação com acetato de sódio, como fonte externa de carbono, a verificaram degradação de 90%, elucidando, assim, a importância do co-substrato na degradação de DCF.

Arias et al. (2018) estudaram a diversidade microbiana das biomassas de reatores UASB (120 L, TDH 20h) acoplado a lodos ativados (56 L, TDH 9h) na remoção de ibuprofeno, bisfenol, sulfametoxazol, trimetofan, naproxeno e estradiol. Ambos os reatores foram alimentados com esgoto sanitário e 18mgN L⁻¹ (na forma de cloreto de amônio) como fonte suplementar de nitrogênio. A partir da caracterização via sequenciamento do RNAr 16S, os autores identificaram bactérias nitrificantes e anammox, principalmente *Nitrospira*, relacionada à oxidação do nitrito em nitrato. Também, foi identificada abundância relativa predominante de *Sphingobacterium* na condição com hormônio estradiol, sendo assim, associados à degradação heterotrófica de compostos recalcitrantes sob condições desnitrificantes. Ademais, foi observado sintrofismo microbiano entre arqueias metanogênicas e bactérias desnitrificantes. Tal possibilidade contribuiu para degradação de 90% do ibuprofeno, a partir de 100 µg/L. Tais observações podem ser

corroboradas pelos estudos de Tran et al (2009) e Alvarino et al. (2016), os quais verificaram a influência da nitrificação e desnitrificação na remoção do ibuprofeno, que resultou na disponibilidade de carbonos secundários e terciários em cadeias alquílicas lineares da molécula para hidroxilação pelas metanogênicas.

Navrozidou et al. (2019) avaliaram a diversidade microbiana de reator de leito imobilizado aplicado na remoção de diclofenaco de esgoto sanitário em condições aeróbias, por meio do sequenciamento do RNAr 16S. A partir da análise das populações microbianas identificadas no inóculo, proveniente do sistema de lodos ativados, os autores verificaram a predominância de *Rhodanobacter* e *Granulicella* (superior a 30%) nas condições com DCF (400 mg L⁻¹) como única fonte de carbono. Sob tais possibilidades, os autores associaram estes gêneros à capacidade de se adaptarem a altas concentrações do fármaco.

O sintrofismo entre populações microbianas também foi observado por Boon et al., (2000). Os autores identificaram *Comamonas* na biomassa do reator de lodos ativados e relacionaram este gênero à degradação de 3-cloroanilina. Ademais, foram identificados e isolados *Acinetobacter* e *Arthrobacter* com maiores abundâncias relativas na condição com *p*-nitrofenol, enquanto *Citrobacter*, foi isolado e identificado em estações de tratamento de esgoto, sendo associado à degradação de compostos aromáticos, principalmente compostos fenólicos em mono e diclorofenóis (QIU et al., 2009).

Kraigher et al. (2020) investigaram a influência do diclofenaco na biomassa do inóculo proveniente de lodos ativados em reatores operados em bateladas com concentrações crescentes deste fármaco durante 41 dias. A partir do RNAr 16S das fases operacionais em que o diclofenaco foi a única fonte de carbono (0,2 a 5,0 mgDCF L⁻¹) foram identificados em maior abundância relativa *Comamonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* e *Aeromonas*. Segundo os autores, estes gêneros foram relacionados com o potencial de degradação de compostos aromáticos (GHELFI et al., 2015; CHEN et al., 2016; DELFORNO et al., 2019).

Kasonga et al. (2020) avaliaram a viabilidade do consórcio fúngico *T polyzona*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Mucor circinelloides* e *Rhizopus microsporus* em reatores operados em bateladas sequenciais na remoção da carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno. Os autores notaram maior eficiência de remoção a partir do sexto dia com a produção de enzimas lignolíticas, resultando na degradação de 97,41 ± 0,25% da carbamazepina, 99,83 ± 0,12% de diclofenaco e 99,91 ± 0,08% de ibuprofeno, para valores iniciais de 1,0, 1,2, 1,15 mg/L, respectivamente. Conforme o trabalho citado, os autores propuseram uma rota metabólica que garantisse a degradação dos fármacos, a partir da

hidrólise e oxidação das moléculas de interesse, além de sucessivas reações de oxidação do anel aromático.

Outra possível rota de degradação do diclofenaco refere-se à ω -oxidação do grupo metila terminal seguida pela β -oxidação do grupo carboxílico da estrutura molecular do composto organoclorado (BOUJU et al, 2016). Além disso, segue-se com a clivagem oxidativa das unidades de carbono gerando a abertura do anel para acetil-CoA e intermediários ácidos, seguindo para sua oxidação a CO₂. Este mecanismo é semelhante em compostos aromáticos como o surfactante LAS (Lara-Martin et al., 2010).

Outra rota de transformação deste fármaco é pela via metabólica proposta por Marco-Urrea et al. (2009). Segundo os autores, a cadeia isopropílica do ibuprofeno é oxidada, a 2-hidroxi ibuprofeno 1-hidroxi ibuprofeno seguida pela 1,2-hidroxi-ibuprofeno. Em seguida, as transformações desta molécula incluem descarboxilação, quebra do anel aromático e formação da quinona.

Estudos conduzidos por Jewell et al (2016) selecionaram reações de hidroxilação e descarboxilação como principais rotas de transformações da molécula de diclofenaco em lodos ativados. Na molécula do fármaco, o anel aromático clorado pode ser hidroxilado com formação de 4'-hidroxi-diclofenaco (4'OHDCF). Em seguida, este metabólito intermediário é descarboxilado, subsequente da conjugação do grupo carboxílico do 4'-OHDCF para a hidroxila, formando um grupo aminoclorado e ácido fenilacético (BOUJU et al, 2016).

Conforme Marchlewicz et al. (2016), a degradação do ibuprofeno pode ocorrer via hidroxilação do anel aromático e da cadeia alifática através das enzimas monooxigenases alifática, fenol e hidroquinona. Esta derivatização da molécula parental pode gerar o metabólito principal 2-hidroxi-ibuprofeno, além do 1,4 hidroquinona, gerado pela atividade tiolase e pela síntese do acetilCoA, em seguida, esta molécula é convertida em 2-hidroxi-1,4-quinol. A enzima hidroxiquinol 1,2-dioxigenase liga preferencialmente ao 2-hidroxi-1,4-quinol e promove a orto clivagem deste composto em ácido 3-hidroxi-cis.

Em sistemas biológicos de lodos ativados, Peng et al. (2019) propuseram a atuação de três possíveis vias metabólicas em condições aeróbias aplicadas na degradação de sete fármacos a partir de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dentre os metabolismos propostos foram incluídos a nitrificação (degradação autotrófica), oxidação da matéria orgânica (degradação heterotrófica) e ambas de forma sintrófica (processo mixotrófico – nitrificação + desnitrificação). Para isso, os autores operaram isoladamente cada processo em reatores em escala de bancada (4,2 L), com inóculo proveniente de lodos ativados e substrato sintético,

todos em condição aeróbia. Para os reatores operados em metabolismo autotrófico, houve a adição de cloreto de amônio como fonte de energia e nitrogênio. Enquanto na condição desnitrificante foram adicionados nitrato de potássio como fonte nitrogenada, além do acetato de sódio e glicose como substratos orgânicos. Os autores observaram a estabilização da remoção de matéria orgânica e íon amônio nos reatores autotrófico, heterotrófico e misto após 22, 16 e 18 dias de operação, respectivamente. Após a adição de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos fármacos, não observaram variação dos parâmetros de monitoramento. Para a degradação do ibuprofeno, foi notada a predominância das três rotas metabólicas após 50 horas de operação, seguidas pela eficiência de remoção de 11,6% por nitrificação, 26,6% por consumo de matéria orgânica e 32,8% pelo processo mixotrófico. Ao contrário do que foi obtido para o ibuprofeno, os autores não reportaram remoção significativa do diclofenaco nos reatores; provavelmente, sob tais condições ocorreu persistência deste composto ao processo aeróbio. Por conseguinte, a remoção do diclofenaco tem sido reportada em condições anóxicas (ZWIENER; FRIMMEL, 2003; KS et al., 2016) e anaeróbias (FOUNTOULAKIS; STAMATELATOU; LYBERATOS, 2008; SYMSARIS et al., 2015).

Além dos autores supracitados, o estado da arte relacionado à identificação de gêneros em inóculos aplicados na remoção e degradação dos fármacos DCF e IBU é apresentado nas Tabelas 2.25 a 2.26.

Tabela 2.25. Principais gêneros associados a degradação de fármacos

Reator/ condição	Substrato	Origem do inóculo	Principais gêneros associados à degradação do DCF e IBU	Referências
MBR/anóxica	Esgoto sanitário, 14,0 µgDCF L ⁻¹ e 10,0 µgIBU L ⁻¹	Lodos ativados	<i>Nitrossomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Accumulibacter</i>	(SERRANO et al., 2011)
Bateladas/anóxico	Meio sintético, 20 µgDCF L ⁻¹ , 20 µgIBU L ⁻¹ e 20 µgNPX L ⁻¹	Biofilme de filtros biológicos	<i>Bacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Cupriavidus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shinella</i> , <i>Sphingomonas</i>	(BORGES et al., 2016)
Batelada/aeróbia	Esgoto sanitário e 5,0 mgDCF L ⁻¹	Lodos ativados	<i>Enterobacter</i>	(AISSAOUI et al., 2017)
Batelada/anóxica	Esgoto sanitário, e 500 a 5000 µgDCF L ⁻¹	Lodos ativados	<i>Nitratireductor</i> , <i>Asticcacaulis</i> , <i>Pseudacidovorax</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Acinetobacter</i>	(NGUYEN et al., 2019)
Reator de leito ascendente redutor de sulfato/anaeróbio	5 antibióticos (25 – 100 µg L ⁻¹) e 3 anti-inflamatórios não esteroidais (100 – 150 µg L ⁻¹)	Lodo anaeróbio	<i>Desulfobacter</i>	(JIA et al., 2019)
Bateladas/anaeróbia	Meio sintético, 150 mg L ⁻¹ de diclofenaco e ácido mefenâmico	Lodos ativados	<i>Alcaligenes</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Proteus</i>	(MURSHID; DHAKSHINAMOORTHY, 2019)
Bateladas/anaeróbia	Meio sintético e 10,0 µg mL ⁻¹ de diclofenaco	Lodos ativados	<i>Beijerinckia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Nevskia</i>	(ROSSMASSLER et al., 2019)
Reator aeróbio	Meio sintético e 3,5 mg L ⁻¹ de hormônios: estrona, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol	Lodos ativados	<i>Emticicia</i> , <i>Nusella</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Isoptericola</i> , <i>Novosphingobium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Altererythrobacter</i>	(BERNARDELLI et al., 2019)
Bateladas/anaeróbia	Meio sintético e 10 g L ⁻¹ de citrato, lactose e sucrose, suplementado com 2,0 mg L ⁻¹ de sulfametoxazol	Inóculo proveniente do tratamento de efluentes de suinocultura	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i>	(FAN; YANG; CHANG, 2019)

Tabela 2.26. Principais gêneros associados a degradação de fármacos (cont.).

Reator/ condição	Substrato	Origem do inóculo	Principais gêneros associados à degradação do DCF e IBU	Referências
Bateladas/anaeróbia	Esgoto sanitário, 7,11 mgDCF L ⁻¹ e 6,11 mgIBU L ⁻¹	UASB	<i>Smithella</i> , <i>Sulfuricurvum</i> , <i>Synthophus</i> , <i>Dechloromonas</i> , <i>Arcobacter</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Thauera</i> , <i>Acidovorax</i>	(GRANATTO et al., 2020a)
Batelada/anóxico	Meio sintético, 2,0 mgDCF L ⁻¹ e 2,0 mgSMX L ⁻¹	Sedimentos com raízes de leguminosas	<i>Microbacterium</i>	(SAUVÊTRE et al., 2020)
<i>Wetland</i> /anóxico	Esgoto sanitário e 0,01 µM carbamazepina, diclofenaco, metoprolol, sulfametaxazol	Decantador primário de ETE	<i>Flavobacterium</i> , <i>Tetrasphaera</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Oceanicella</i> , <i>Granulicatella</i> .	(RUPPELT et al., 2020)
Bateladas/anaeróbia	Meio sintético e 5,0 µg mL ⁻¹ de diclofenaco	Cultura pura	<i>Escherichia</i>	(MATEJCZYK et al., 2020)
Reator de membranas (MBR)/anóxico	Substrato sintético com amônia, acetato e metanol, 4 – 800 nM de diclofenaco, metoprolol, fluoxetine, carbamazepine	Lodos ativados	<i>Dokdonella</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Nitrossomonas</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Flavobacterium</i>	(RIOS-MIGUEL; JETTEN; WELTE, 2021)
Reator acidogênico/anaeróbia	Esgoto sanitário e 170 µM carbamazepina	Lodo anaeróbio	<i>Escherichia</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Proteiniphilum</i> , <i>Ideonella</i> , <i>Desulfatirhabdium</i> , <i>Desulfominile</i>	(TAHIR et al., 2021)
Reator EGSB/ anaeróbia	Esgoto sanitário TDH = 36 a 20h diclofenaco (106±32µg L ⁻¹), ibuprofeno (166±55µg L ⁻¹), propranolol (201±113-250±141 µg L ⁻¹) e triclosan (185±148 µg L ⁻¹)	UASB	<i>Syntrophobacter</i> , <i>Smithella</i> , <i>Macellibacteroides</i> , <i>Syntrophus</i> , <i>Blvii28_wastewater-sludge_group</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Methanosaeta</i> ; <i>Syntrophobacter</i> e <i>Methanosaeta</i> ; <i>Smithella</i> , <i>Caldisericum</i> e <i>Methanobacterium</i>	(GRANATTO et al., 2021b)

2.6 Aceptores de elétrons e co-substratos metabólicos

No metabolismo microbiano ocorrem reações de oxi-redução nas quais ocorre a assimilação e degradação de nutrientes e compostos orgânicos em energia e síntese celular a partir do anabolismo e catabolismo, respectivamente.

Os principais trabalhos aplicados na remoção de fármacos com a suplementação de aceptores de elétrons são elucidados na Tabela 2.27.

Em geral, os fármacos podem ser assimilados sob condições aeróbias, anaeróbias ou anóxicas conforme apresentado na Tabela 2.27. Phan et al. (2018) constataram que a presença de grupos funcionais doadores de elétrons, como $-NH_2$, $-OH$, $-CH_3$, $-OCH_3$, na estrutura molecular de compostos recalcitrantes são mais susceptíveis à degradação, como no caso do diclofenaco com a presença da amina ($-NH_2$) e do ibuprofeno com a hidroxila ($-OH$).

Sob condição anóxica pode-se observar maior diversidade e riqueza populacional de microrganismos hidrolíticos e fermentativos, especificamente do filo Firmicutes (NGUYEN; KHANAL, 2018; CHEN et al., 2020b). Koumaki et al. (2017) avaliaram a remoção do ibuprofeno e diclofenaco em diferentes condições redox em sedimentos de rios sob aerobiose e anaerobiose. Conforme os autores, a remoção do ibuprofeno a partir de $40 \mu\text{g L}^{-1}$, foi degradado 90% em condições aeróbias e 40% em metanogênese com menor produção de metano em amostras com o fármaco do que em amostras controles sem tal composto.

Devido às baixas concentrações dos fármacos no esgoto sanitário, e muitas vezes por esses serem tóxicos e resistentes à degradação, estes compostos não são considerados como fontes de substrato de crescimento e energia para os microrganismos, tornando necessária a indução do cometabolismo com suplementação de fontes de carbono para a manutenção da biomassa e indução das enzimas correspondentes e cofatores para a degradação (GHATTAS et al., 2017; TRAN et al., 2013).

O cometabolismo tem sido aplicado em culturas puras e mistas para a degradação de fármacos em sistemas biológicos de tratamento (ARIAS et al., 2018; DAWAS-MASSALHA et al., 2014; KRUGLOVA et al., 2014; TRAN et al., 2013). Neste processo, os fármacos não são utilizados como fontes primárias de carbono, pois estes são formados por estruturas complexas e são dificilmente degradáveis e disponíveis para a assimilação microbiana. Com isso, os co-substratos podem induzir a produção de enzimas que

viabilizam a metabolização dos compostos recalcitrantes de forma conjunta a uma série de reações redox em paralelo (KRUGLOVA et al., 2014; TRAN et al., 2013).

O acoplamento da assimilação dos compostos recalcitrantes e das fontes primárias de carbono, co-substratos orgânicos, pode obter resultados variados a depender do substrato e da biomassa.

Na operação de reatores contínuos aplicados ao tratamento de esgoto sanitário, Pomiès et al. (2014) observaram a influência das fontes nitrogenadas na seleção da condição óxica e anóxica, e do co-substrato orgânico para o cometabolismo na remoção do ibuprofeno e diclofenaco com $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ afluyente. Durante a fase aeróbia e com suplementação da fonte de carbono facilmente degradável, a remoção desse fármaco foi de 99%, enquanto na fase anóxica, sem co-substrato, foi observado 46% de degradação. Ao contrário do ibuprofeno, o diclofenaco foi adsorvido na biomassa (10%). Além disso, a remoção deste organoclorado não foi significativa em todas as fases de operação.

Bragança et al. (2016) avaliaram a eficácia do cometabolismo na remoção dos fármacos diclofenaco, paracetamol, naproxeno, nimesulida e ibuprofeno a partir da suplementação com pentano em reatores aeróbios. Sob tais condições foi verificado que o co-substrato favoreceu a transformação do ibuprofeno, paracetamol e naproxeno a partir de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de fármacos. No entanto, não houve remoção significativa para o diclofenaco e foi observada lenta degradação da nimesulida. Ademais a degradação do ibuprofeno e paracetamol, em função do anel aromático em sua estrutura, ocorreu em altas taxas específicas conforme a cinética de primeira ordem. O contrário foi notado para o naproxeno, nimesulida e o diclofenaco, cuja composição química corresponde a dois anéis aromáticos, tornando a velocidade específica de degradação nula a partir de $10 \mu\text{M}$ devido à maior recalcitrância. Em todas as condições, o pentano foi removido em 44% a partir de $0,013\text{mM}$ inicial.

Kamal et al. (2020) identificaram uma relação direta entre a capacidade de degradação do fármaco anticonvulsivo gabapentina (GABA) com a presença da glicose como fonte secundária de carbono em reatores em bateladas inoculados com biomassa de lodos ativados. Conforme os autores, nas condições em que o fármaco foi utilizado como única fonte de carbono a partir de 10 mg L^{-1} , a remoção do GABA foi de 23,3% em 40 dias, ademais nestes ensaios foram observados níveis de toxicidade aguda com alterações do crescimento da biomassa. No entanto, em condições com a suplementação de 150 mg L^{-1} de glicose como co-substrato, a remoção do fármaco foi de 97% e com redução do efeito tóxico do micropolvente em relação à biomassa.

Bezsenyi et al. (2020) notaram maior remoção do anti-inflamatório diclofenaco ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e do antibiótico sulfametoxazol ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com o cometabolismo. Este estudo foi conduzido em reatores em sistema contínuo, inoculados com biomassa proveniente de lodos ativados e alimentados com meio sintético. A influência do cometabolismo nos sistemas biológicos foi avaliada com a adição de metanol, ácido acético e etilenoglicol na alimentação dos reatores. Sob tais condições foi observada remoção dos dois fármacos com efeito significativo em cometabolismo, quando comparado a fase controle, sem co-substratos. Nas condições com o ácido acético foi observada maior degradação do sulfametoxazol.

Alvarino et al. (2020) analisaram o tratamento de água residuária hospitalar em reator biológico operado em batelada sequencial em escala piloto (2.200 L) acoplado ao sistema de membranas de microfiltração. Para isso, o reator foi inoculado com a biomassa de um sistema de tratamento de esgoto sanitário municipal, com configurações anaeróbias, anóxicas e aeróbias, além de ter sido operado a TDH de 24h. Sob tais condições, foi observada remoção de 95% de ibuprofeno ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), e 70% de diclofenaco ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), para ambos os compostos, via indução cometabólica devido as fontes de carbono água residuária hospitalar fundamental para a síntese de enzimas e degradação dos fármacos.

Tabela 2.27. Principais aceptores de elétrons aplicados em diferentes configurações de reatores.

Operação dos reatores	Alimentação	Concentrações aceptor de elétrons	Inóculo	Concentrações iniciais	Remoção	Referência
Bateladas	Substrato sintético	$20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$	Sedimento de rio	$40 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$	60% de remoção do DCF na presença de nitrato	(KOUMAKI; et al, 2017)
Bateladas	Substrato sintético	O_2 $14,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ $20,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}_4^+$ $50,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{+3}$ $51,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$	Sedimento de rio	Mix $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de analgésicos, beta bloqueadores, para raio X, antiepilépticos e desreguladores endócrinos	100% de remoção dos analgésicos na presença de O_2 , Mn_4^+ , Fe^{+3} e SO_4^{2-}	(SCHMIDT et al, 2017)
Contínuo	Esgoto sanitário	$5,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ $3,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{+3}$ $180 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ $0,87 \text{ mM Fe}^{+3}$	Lodos ativados	80 ng DCF L^{-1} $100 \text{ ng IBU L}^{-1}$	44% de remoção do diclofenaco e ibuprofeno em condições anóxicas 56% de remoção do ibuprofeno em condições com Fe^{+3} e SO_4^{2-}	(MUNZ et al., 2019)
Contínuo	Efluente sintético	SO_4^{2-}	Lodo anaeróbio	5 antibióticos ($25 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$) e 3 anti-inflamatórios não esteroidais ($100 - 150 \mu\text{g L}^{-1}$)	20 – 90% de remoção dos antibióticos 25% de remoção do diclofenaco e 30% de ibuprofeno	(JIA et al., 2019)
Bateladas	Meio sintético	SO_4^{2-}	Lodo anaeróbio	$170 \mu\text{M}$ carbamazepina	46% de remoção da carbamazepina; 90% de remoção do sulfato A presença do sulfato favoreceu a remoção do fármaco	(TAHIR et al., 2021)

2.7 Remoção de diclofenaco e ibuprofeno via redução do nitrato

A desnitrificação heterotrófica é a via de conversão biológica que ocorre por meio de bactérias facultativas que assimilam a matéria orgânica como fonte de carbono e energia e utilizam o nitrato como aceptor de elétrons terminal na oxidação do substrato orgânico. Por esta via, o processo energético é catalisado por quatro tipos de enzimas: nitrato redutase (Nar), nitrito redutase (Nir), óxido nítrico redutase (Nor) e óxido nitroso redutase (Nos) (LUNDBERG; WEITZBERG, 2009).

Em esgoto sanitário, as principais fontes nitrogenadas referem ao nitrogênio orgânico, amoniacal, nitrito e nitrato. O lançamento dessas fontes do esgoto sanitário nos cursos hídricos pode acarretar à eutrofização, tal fenômeno reincide ao efeito de toxicidade crônica quanto ao crescimento de culturas aquáticas e ao consumo de oxigênio, acarretando impactos adversos à fauna e aos sistemas de abastecimento.

A desnitrificação é fundamental para o equilíbrio do ciclo biogeoquímico do nitrogênio por retornar o nitrogênio à atmosfera e manter o balanço energético global. Ademais, a desnitrificação tem sido bastante aplicada em sistemas de tratamento de águas residuárias para a remoção biológica de nutrientes. Em reatores biológicos com recirculação, a desnitrificação implica na liberação de íons hidroxila (OH^-). Assim, o incremento de 1,6 mol de OH^- equivale a 1,6 mol de N-NO_3^- reduzido. Em termos de massa, a alcalinidade corresponde a 3,57 mg CaCO_3 / mg N-NO_3^- . Sendo o pH ótimo para que ocorra a desnitrificação correspondente à 7,0 – 8,0 (van HAANDEL & MARAIS, 1999).

Além do pH, Peng (2007) relata que concentrações de oxigênio dissolvido superiores a 1,0 mg L^{-1} podem inibir a desnitrificação. Lu et al (2014) relatam que o oxigênio inibe a desnitrificação heterotrófica por ser um aceptor de elétrons mais eletronegativo e fornecer maior energia para a síntese celular. Com isso, o oxigênio molecular será preferencialmente reduzido em relação ao nitrato. Dessa forma, segundo Pochana e Keller (1999), baixas concentrações de oxigênio dissolvido são essenciais para altas taxas de redução do nitrato, sendo a eficiência da desnitrificação decrescente em relação à concentração de oxigênio dissolvido (OD) superior a 0,2 mg O_2 L^{-1} . Considerando esses estudos supracitados, a concentração de OD deve ser mantida em valor baixo, para a redução efetiva de nitrato.

Os microrganismos redutores de nitrato podem obter energia através da ativação do substrato e pela redução do anel aromático, favorecendo em sua clivagem. Tal cadeia aromática pode ser totalmente oxidada em CO_2 . No esgoto sanitário, a desnitrificação

ocorre principalmente com gêneros de metabolismo heterotrófico, como *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Spirillum* (METCALF & EDDY, 1991).

Na degradação, algumas fontes de carbono são oxidadas a CO₂, liberando os elétrons para a redução ou produção de hidrogênio. Na presença de nitrato, os microrganismos desnitrificantes o reduzem para o nitrogênio molecular (N₂) resultando na transferência de elétrons por átomo de nitrogênio.

Segundo Cabello et al. (2004), a desnitrificação não demanda gastos energéticos, no entanto, em condição heterotrófica, a reação depende da presença de substratos orgânicos para serem oxidados, tornando necessária a adição de fontes externas de carbono em casos de baixas concentrações, uma vez que este processo ocorre no final das etapas de tratamento de efluente, onde a maior parte da matéria orgânica foi removida.

Segundo Lu et al (2014), a fonte doadora de elétrons é fundamental para a desnitrificação que ocorre em sistemas de lodos ativados e em processos terciários das ETEs. Nesta etapa, a quantidade de matéria orgânica biodegradável é baixa, o que torna necessária a adição suplementar de carbono orgânico. Neste contexto, a adição de substratos prontamente biodegradáveis como álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) pode induzir o metabolismo desassimilativo das bactérias desnitrificantes, também observado por Hallin et al. (2006) e Baytshtok et al. (2009). Assim, para que ocorra a redução do nitrato é essencial a presença do doador de elétrons no equilíbrio estequiométrico, preferencialmente uma fonte de carbono facilmente degradável.

Além disso, as fontes de carbono facilmente degradáveis favorecem a remoção dos compostos químicos persistentes. Motteran et al (2014) observaram que a utilização da sacarose como doador de elétrons não resultou na remoção do surfactante aniônico linear álcool etoxilado (4,7 a 107,4 mg L⁻¹ de LAE); no entanto sua presença afetou em maior produção de ácidos orgânicos voláteis em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sintético.

Além disso, Andrade et al (2016) avaliaram a remoção do surfactante LAS por bactérias desnitrificantes com adição de etanol como co-substrato e 2,0 ± 1,5 mg L⁻¹ de nitrato em reator anaeróbio de leito fluidificado com TDH de 8 a 12 horas. Neste estudo, foi observado que o surfactante não alterou a remoção de nitrato. Na condição com etanol e nitrato (100 mgEtOH L⁻¹ + 100mgNO₃⁻ L⁻¹) foi observada maior remoção de LAS (99% para 22,5 mg LAS L⁻¹), principalmente, em TDH de 8 horas.

A aplicação das bactérias desnitrificantes na degradação de compostos orgânicos tóxicos é bastante promissora (BOUWER, 1997; CARBALLA et al., 2004; OZDEMIR et al., 2015; ARIAS et al., 2018; OOI et al., 2018). Segundo Fuchs (2008), a rota de degradação dos compostos aromáticos via desnitrificação oferece maior rendimento energético e é mais favorável termodinamicamente do que a metabolização por anaeróbios estritos, bactérias redutoras de sulfato e bactérias redutoras de ferro. Assim, a utilização das bactérias desnitrificantes para a degradação dos compostos recalcitrantes pode ser alternativa promissora (DOLFING et al., 1990; XU et al., 2019).

A desnitrificação dos compostos aromáticos polihalogenados e fenóis envolve a geração de um intermediário comum, o benzoil-CoA. Após sua formação, o anel aromático é reduzido pela β -oxidação da cadeia carbônica, seguido pela clivagem do anel aromático e mineralização via glutaril-CoA. Os elétrons do anel aromático de benzoil-CoA são impulsionados pela hidrólise das moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). Enquanto o produto cíclico não aromático torna-se hidroliticamente aberto e é oxidado em acetil-CoA. Os microrganismos envolvidos nestas reações são pertencentes a subclasse β e γ -*Proteobacteria* (Zhang et al., 2012).

A desnitrificação pode ocorrer mediante a atividade de diversas espécies de bactérias desnitrificantes, comumente encontradas em sistemas biológicos de tratamento de esgoto, tais como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Acinobacter* (METCALF e EDDY.,1998). Lu et al (2014) realizaram estudos de sequenciamento do gene RNA 16S e identificaram bactérias desnitrificantes no esgoto sanitário. Neste estudo, os autores observaram que a maioria dos filos é taxonomicamente afiliada a *Proteobacteria* (59%) e *Bacteroides* (16%).

Meade et al (2001) avaliaram a degradação de fármacos da classe dos anti-inflamatórios (ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) por bactérias desnitrificantes *Pseudomonas putida* e *Alcaligenes xylosoxidans* em reator híbrido e obtiveram 90% de eficiência de remoção para 0,18 mg L⁻¹ afluente em 9 dias de degradação.

De forma semelhante, Wang et al (2011) observaram que a presença dos produtos farmacêuticos pode afetar a integridade da membrana das bactérias promovendo a lise e morte celular. Assim, os fármacos podem gerar ligeira desintegração de grânulos, aspecto também verificado por Yang et al. (2013).

Barbieri et al. (2012) observaram efeito de complexação do diclofenaco em condição desnitrificante com menor remoção (10%) do fármaco (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) em reatores em batelada suplementados com o acetato de sódio. Os autores observaram remoção parcial

do composto nas fases iniciais (30%), com a formação do metabólito Nitro-diclofenaco seguido da dessorção do composto parental no final do experimento, retratando o efeito de complexação do diclofenaco por ser composto por uma amina secundária.

Ozdemir et al., (2015) obtiveram 15% de degradação anóxica do diclofenaco e ibuprofeno ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) por meio de testes em bateladas e inóculo de lodos ativados, com nitrato ($0,85$ a $3,4 \text{ g.L}^{-1}$) e diclofenaco com 50 mg L^{-1} inicial e aumento gradativo para 250 a 300 mg L^{-1} . Os fármacos foram dissolvidos em metanol e mantidos a 100 rpm e 30°C . Neste estudo, os autores observaram que a adição dos fármacos não teve efeito significativo na desnitrificação e redução do nitrato.

Katsou et al. (2016) avaliaram a biorremediação de cinco fármacos por via desnitrificante em reatores em bateladas sequenciais em escala piloto (28 L) com inóculo de lodos ativados e efluente de UASB com 10 a 500 mg L^{-1} de ibuprofeno, paracetamol, doxiclina e tetraciclina. Os autores constataram que o aumento da concentração dos fármacos nos ensaios resultou no aumento da inibição das bactérias desnitrificantes. Além disso, verificaram que o maior efeito de inibição foi para 250 mg L^{-1} de ibuprofeno. Segundo os autores, esta concentração do fármaco promoveu a desintegração da biomassa.

Andrade et al (2017) verificaram $99 \pm 3\%$ de remoção para $22,5 \pm 5,9 \text{ mg L}^{-1}$ de LAS afluente + 100 mg L^{-1} de nitrato + 100 mg L^{-1} de etanol em reator anóxico de leito fluidificado em escala de bancada, em TDH de 12 horas. A partir de inóculo de lodos ativados foram identificadas bactérias semelhantes a *Acinetobacter*, *Dechloromonas*, *Pseudomonas* e *Zoogloea*.

Segundo Polesel et al (2017) o controle do contato da biomassa com o afluente é fundamental para a remoção de compostos recalcitrantes. Os autores avaliaram a remoção de β -bloqueadores, diclofenaco e ibuprofeno em biorreatores pré desnitrificantes de leito móvel sob condições de fluxo contínuo alimentado com esgoto doméstico com diferentes substratos orgânicos. A remoção obtida do diclofenaco e ibuprofeno foi de 10% a partir de 350 ng L^{-1} . Além disso, no estudo foi observada possível transformação dos metabólitos conjugados em sulfatos e gluronídeos, o que foi responsável pelo aumento das suas concentrações nos reatores.

Arias et al., (2018) verificaram remoção de 5% para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco e 40% de remoção de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno afluente de reator UASB seguido de lodos ativados (tanque de nitrificação e desnitrificação) em escala piloto em TDH de 9 horas e 21°C para carga orgânica de $680 \pm 190 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Além disso, as maiores taxas de desnitrificação

foram obtidas em maior TDH, por promover a maior adaptação da biomassa e aumento da carga de substratos orgânicos (QUINTANA et al., 2008).

2.8 Reator de leito fluidificado

Sistemas de tratamentos de efluentes baseados em reatores de leito fluidificado consistem em processos biológicos nos quais a existência do biofilme aderido ao meio suporte promove a adesão microbiana e a recirculação do efluente para fluidificação do leito para favorecer a degradação do produto alvo. Assim, a eficiência do tratamento é relacionada com a formação e desenvolvimento do biofilme, vazão afluyente e das características do meio suporte (KURODA et al, 1988).

Os reatores de leito fluidificado têm orientação vertical e a massa líquida é circulada em fluxo ascendente promovendo a suspensão das partículas de suporte dos microrganismos formadores do biofilme (ERSEVER et al., 2014; KIM et al., 2011). A condição do leito fluidificado se dá quando a perda de carga do fluido é constante ao aumento da velocidade ascensional (CAMPOS, 1999). Na parte superior, o separador trifásico fundamenta na separação de líquido, biogás e sólidos. Dentre as vantagens desta tecnologia, citam-se maior estabilidade de manutenção e de controle em comparação aos reatores UASB, maior contato e recirculação do efluente com a transferência de biomassa permitindo maior remoção de matéria orgânica e produtos tóxicos em menor Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) (BUFFIERE; MOLETTA; FONADE, 1995; OLIVEIRA et al., 2010).

A biomassa adere e se desenvolve no meio inerte, para, em seguida, formar o biofilme em contato com o substrato. Dentre os materiais suportes, o carvão ativado, areia e basalto são os principais utilizados em trabalhos com remoção de compostos orgânicos em esgoto sanitário. Ademais, a seleção desse material é feita mediante aos testes de porosidade, rugosidade e carga elétrica. Após a formação do biofilme, o consórcio microbiano é envolvido em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares com produção de polímeros insolúveis (WERTHER; HARTGE, 2002). Pela maior maturação do biofilme, a configuração do RLF favorece a remoção de compostos recalcitrantes.

Dentre os parâmetros operacionais do RLF, o Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) interfere diretamente no metabolismo microbiano na configuração reacional em e conversão da matéria orgânica biodegradável e recalcitrante. Tal parâmetro corresponde ao tempo de contato dos microrganismos ao substrato, geralmente, em sistemas anóxicos são

operados baixos valores de TDH (2 a 16 horas), enquanto em reatores anaeróbios, o TDH usado é em maior valor (8 a 120 horas) (LU; CHANDRAN; STENSEL, 2014).

Hwang et al. (2005) analisaram a desnitrificação em reator de leito fluidificado em escala piloto com suplementação de etanol como doador de elétrons. O meio suporte utilizado foi constituído por partículas de carvão ativado. Após a inoculação com inóculo de lodos ativados com predomínio de *Azoarcus*, seguiu-se a operação contínua em TDH de 48 horas, no qual foram observadas mudanças significativas na comunidade microbiana. Alterações do pH e concentrações de nutrientes foram responsáveis pelo aumento da abundância relativa de outros gêneros, como *Dechloromonas*, *Pseudomonas* e *Hydrogenophaga* em 60 dias de operação.

Cruz-Morató et al., (2013) analisaram a remoção de fármacos e produtos de higiene pessoal em reator de leito fluidificado. O reator (10L) foi alimentado com esgoto sanitário da Universidade de Barcelona, Espanha, e inoculado com biomassa de fungo *trametes versicolor* com 1,8 gSSV L⁻¹ suplementado com 300 g L⁻¹ de glicose e 0,675 g L⁻¹ de tartarato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Os autores obtiveram remoção completa do ibuprofeno (12,61 µg L⁻¹), naproxeno (35,58 µg L⁻¹) e do β-bloqueador propranolol (0,06 µg L⁻¹) em TDH de 20 horas. Ademais, maior estabilidade da biomassa microbiana e maior adaptação aos compostos tóxicos foram observados em função da maturação do biofilme.

Andrade et al (2017) avaliaram a influência da variação do TDH (8 a 12 horas) em reator de leito fluidificado para a remoção de LAS em água residuária de lavanderia. Os autores observaram que a adição do etanol em TDH de 12h influenciou diretamente na remoção do surfactante.

Estudos de processos para tratamento de efluentes e remoção de micropoluentes emergentes são necessários, os quais se iniciam em escalas menores e laboratoriais, com efluentes sintéticos para viabilizar a aplicação em escala aumentada ou piloto com efluentes reais. Dessa forma, destaca-se a necessidade do estudo criterioso sobre a degradação dos fármacos em reator contínuo de leito fluidificado sob condições desnitrificantes e acidogênicas com a avaliação dos parâmetros operacionais, co-substrato e fonte nitrogenada.

3 Hipóteses e Objetivos

Os fármacos diclofenaco e ibuprofeno são compostos recalcitrantes em reatores biológicos de Estação de Tratamento de Esgoto e consórcios microbianos em condições desnitrificantes podem degradar tais compostos. Dessa forma, levantou-se a hipótese da possibilidade de otimizar a remoção destes micropoluentes em condição desnitrificante com nitrato como aceptor de elétrons e etanol como co-substrato e doador de elétrons. Além disso, alterações no tempo de detenção hidráulico (TDH) e condições nutricionais do reator de leito fluidificado podem ser favoráveis para maior remoção dos fármacos em esgoto sanitário. Assim, as hipóteses levantadas nesse trabalho foram as seguintes:

Hipótese 1: Diferentes concentrações de nitrato e etanol influenciam na remoção dos fármacos em reatores em batelada e contínuo de leito fluidificado.

Hipótese 2: Alterações no TDH do reator de leito fluidificado podem influenciar a remoção da matéria orgânica, DCF e IBU.

Hipótese 3: O nitrato adicionado ao reator RLF pode favorecer as populações desnitrificantes e melhorar a remoção do DCF e IBU.

Hipótese 4: A maior remoção de DCF e IBU ocorre em condições de desnitrificação via remoção do nitrato.

Hipótese 5: Ocorre alteração da abundância relativa das populações de bactérias dos reatores em batelada e fluidificado em função das condições nutricionais.

Objetivo principal

Avaliar a remoção do diclofenaco e ibuprofeno em reatores em batelada e contínuo de leito fluidificado, sob condições desnitrificantes em ambas as configurações de reatores.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Avaliar a influência do nitrato e etanol na remoção do diclofenaco e ibuprofeno.

Objetivo 2: Avaliar a remoção dos fármacos e matéria orgânica para diferentes TDH (18h e 12h) em reator contínuo de leito fluidificado.

Objetivo 3: Avaliar a influência do nitrato em diferentes fases operacionais do RLF na remoção do DCF e IBU.

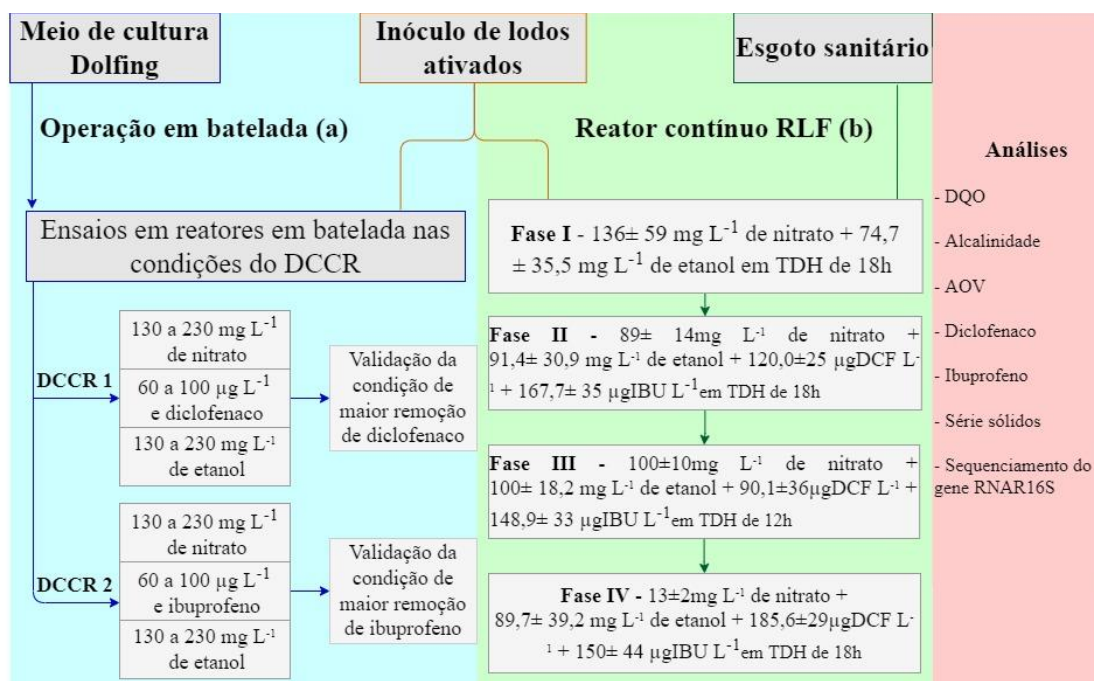
Objetivo 4: Caracterizar a taxonomia e possíveis vias metabólicas das populações de bactérias da biomassa dos reatores de maior remoção dos fármacos em batelada e do reator contínuo de leito fluidificado para diferentes condições nutricionais e operacionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma experimental

A degradação dos anti-inflamatórios diclofenaco e ibuprofeno sob condições desnitrificantes foram avaliadas em ensaios em reatores em batelada e reator contínuo de leito fluidificado em escala aumentada; conforme delineado no fluxograma geral da Figura 4.1.

Figura 4.1. Fluxograma geral dos experimentos em reatores em batelada e reator contínuo de leito fluidificado.



Os testes em batelada foram realizados a fim de analisar a degradação dos fármacos e do potencial desnitrificante do inóculo por meio de dois delineamentos do composto central rotacional (DCCR) para cada fármaco, com a variação da concentração inicial de etanol (mg L⁻¹), nitrito (mg L⁻¹), e diclofenaco/ibuprofeno (µg L⁻¹). Além disso, amostras do inóculo e ao final da operação dos reatores em batelada, bem como do RLF foram processadas visando a caracterização taxonômica via sequenciamento do gene RNAr 16S, além das inferências metabólicas.

A partir dos resultados observados nos experimentos em bateladas, as condições foram direcionadas para a operação do Reator de Leito Fluidificado, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto do município de São Carlos (ETE Monjolinho), com a finalidade de avaliar a remoção do diclofenaco e ibuprofeno em esgoto sanitário. O período de

operação foi dividido em 3 etapas diferenciadas pelo TDH (12h e 18h) e pela presença do nitrato, como fonte suplementar de nitrogênio e aceptor de elétrons no esgoto sanitário, além de etanol como co-substrato metabólico.

4.2 Inóculo

Lodo aeróbio utilizado nos experimentos em batelada e na operação do RLF foi proveniente do sistema de lodos ativados usado no tratamento de esgoto sanitário da Indústria de Motores Volkswagen® localizada no município de São Carlos/SP.

O lodo foi coletado em frascos plásticos com capacidade de 10 L, mantido à 4° C por no máximo 3 dias em câmara fria. Conforme a análise de sólidos totais (APHA,2012), o inóculo foi constituído por $16,35 \pm 2,26 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos totais (ST), $13,54 \pm 2,13 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos totais voláteis (STV) e $2,81 \pm 0,50 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos totais fixos (STF).

4.3 Meio de cultura

A base do meio nutricional dos reatores em batelada foi descrito por Dolfing et al. (1990) e a solução traço de metais foi estabelecida por Zeyer e Kearney (1982) conforme apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2. A solução de micronutrientes foi preparada mensalmente e mantida sob refrigeração em frasco âmbar de 1,0 L. Salienta-se que tais preparos foram adicionados apenas para a alimentação dos reatores em bateladas.

Além do meio, foram preparadas soluções padrões de nitrato de sódio (NaNO_3) ($3,0 \text{ g L}^{-1}$) e etanol ($3,0 \text{ g L}^{-1}$). As soluções padrões individuais de diclofenaco ($9,8 \text{ g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($9,13 \text{ g L}^{-1}$) foram solubilizadas em metanol (99,9%) previamente preparadas e quantificadas em UHPLC-MS/MS. Estas soluções foram posteriormente diluídas para as respectivas condições analisadas nos controles e via DCCR, e adicionadas nos reatores em batelada.

Tabela 4.1. Composição do meio Dolfing

Componentes	q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
NH_4Cl	0,11 g
KH_2PO_4	0,33 g
Na_2HPO_4	1,2 g
Solução de micronutrientes (Tabela 4.2)	1 mL

Fonte: Dolfing et al. (1990)

Tabela 4.2. Composição da solução de micronutrientes

Componentes	q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada
FeSO ₄ .7H ₂ O	100 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	100 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	25 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	25 mg
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	25 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	25 mg

Fonte: Zeyer e Kearney (1982)

4.4 FÁRMACOS

Os fármacos diclofenaco e o ibuprofeno em estado sólido foram adicionados nas bateladas e na alimentação do RLF foram adquiridos comercialmente no mercado farmacêutico localizado em Araraquara/SP (Brasil) com patamar de pureza para consumo humano. Tais fármacos foram solubilizados em solução de metanol.

4.5 Ensaio em bateladas

Para todos os ensaios controles e do delineamento do composto central rotacional (DCCR) em batelada foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1,0 L de volume total, sendo 330 mL de volume reacional e 670 mL de *headspace* preenchido com Argônio (100%), gás inerte. Todos os reatores em batelada foram inoculados com 1,0 g STV L⁻¹ do inóculo. As condições dos reatores estão delineadas na Tabela 4.3.

Os reatores foram montados em triplicata em frascos fechados com tampa de butila e rosca plástica, mantidos sob agitação de 100 rpm e climatizados a 30±1°C. Foram retiradas 2 mL de amostras da fração líquida com seringas, a cada 1 hora do experimento para análise de nitrato. Nos períodos iniciais e finais do experimento, foram feitas determinações analíticas de pH, DQO (bruta e solúvel) e AOV de acordo com os procedimentos e metodologias descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2012).

Tabela 4.3. Condições dos testes em reatores em batelada

Volume total	1,0 L
Volume <i>headspace</i>	670 mL
Volume reacional	330 mL
Inóculo	1 gSTV L ⁻¹
Meio Dolfig	20% v/v (330 mL)

4.5.1 Avaliação da influência do etanol na remoção de nitrato em reatores controles

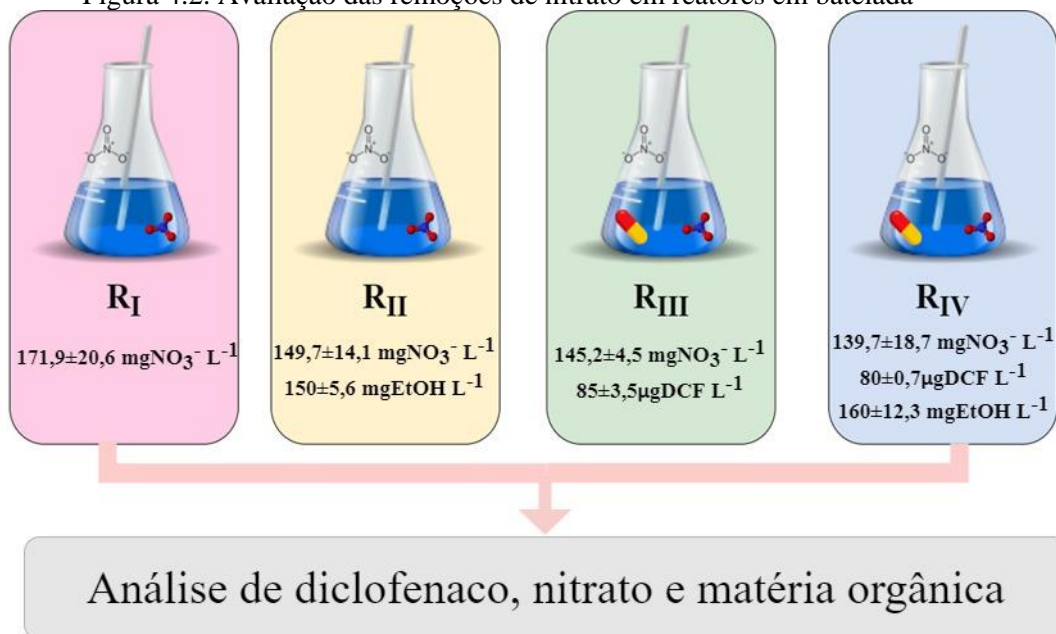
Ensaio preliminares foram realizados em reatores em batelada agrupados nas seguintes condições controles (sem adição dos fármacos): (1A) Reator Controle sem etanol e sob atmosfera Argônio (100%); (2A) Reator Controle com $100 \pm 5,1$ mgEtOH L⁻¹ em atmosfera argônio; (1B) Reator Controle ausente de etanol e sem atmosfera com Argônio (100%); e (2B) Reator Controle com $100 \pm 30,5$ mg L⁻¹ de etanol e sem atmosfera com argônio. Em todas estas condições foi usado o meio de cultura *Dolfing* (Tabela 4.1) suplementado com solução de micronutrientes (Tabela 4.2), $100 \pm 6,5$ mg L⁻¹ de nitrato na forma de nitrato de sódio, a partir de solução mãe contendo 204,54 NaNO₃ mg/L.

4.5.2 Ensaio com diclofenaco

Ensaio em reatores em batelada foram conduzidos para avaliar a influência do etanol e diclofenaco na remoção do nitrato. Para tanto, foram confeccionados reatores em batelada em triplicata nas seguintes condições: (1) reatores com $171,9 \pm 20,6$ mgNO₃⁻ L⁻¹ de nitrato (R_I); (2) reatores com $149,7 \pm 14,1$ mg L⁻¹ de nitrato e $150 \pm 5,6$ mg L⁻¹ de etanol (R_{II}); (3) reatores com $145,2 \pm 4,5$ mg L⁻¹ de nitrato e $85 \pm 3,5$ µg L⁻¹ de diclofenaco (R_{III}) e (4) reatores com $139,7 \pm 18,7$ mg L⁻¹ de nitrato e $80,0 \pm 0,7$ µg L⁻¹ de diclofenaco e $160 \pm 12,3$ mg L⁻¹ de etanol (R_{IV}) (Figura 4.2). Em todas estas condições experimentais foi usado o meio de cultura *Dolfing* (Tabela 4.1) suplementado com solução de micronutrientes (Tabela 4.2) e $150 \pm 10,5$ mg L⁻¹ de nitrato na forma de nitrato de sódio (NaNO₃) em atmosfera argônio (100%), conforme descrito anteriormente.

A avaliação da eficiência de remoção de matéria orgânica, nitrato e diclofenaco foi realizada a partir da coleta da fração líquida no início e fim dos ensaios.

Figura 4.2. Avaliação das remoções de nitrato em reatores em batelada



4.5.1 Avaliação da remoção do diclofenaco em reatores em batelada

Delineamento experimental do composto central rotacional (DCCR) foi realizado para análise da remoção do diclofenaco em reatores em bateladas. Para isso, conduziu-se a confecção da superfície resposta através de três variáveis independentes com 2 níveis em 14 ensaios e três repetições do ponto central. Tais variáveis do planejamento foram as seguintes: nitrato, diclofenaco e etanol identificados como X_1 , X_2 , X_3 , respectivamente (Tabelas 4.4 e 4.5).

A partir da aplicação do delineamento experimental, é possível avaliar os efeitos de diferentes fatores e suas interações, simultaneamente, além de se obter a superfície de resposta predita no ajuste do modelo matemático (CORTES et al., 2018).

A configuração deste delineamento e a análise dos dados foram realizadas via programa Statistica 10[®], com o objetivo de obter faixas ótimas de concentrações para a resposta considerada, dentro da região de máximos identificadas no planejamento precedente. Os fatores estudados foram os seguintes: concentração de nitrato ($95,9 \pm 2,1$, a $250 \pm 10,2 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($57 \pm 2,0$ a $146,3 \pm 22,3 \mu\text{g L}^{-1}$) e etanol ($100,5 \pm 25,3$, a $278,9 \pm 13,2 \text{ mg L}^{-1}$), sendo considerada a remoção de diclofenaco como resposta desta avaliação, por ser fundamental para a análise da capacidade microbiana de degradação do micropoluentes e conhecimento do processo biológico. Em todas estas condições foi usado o meio de cultura Dolfig (Tabela 4.1) suplementado com solução de micronutrientes (Tabela 4.2).

Tabela 4.4. Ensaios de remoção do diclofenaco via DCCR em reatores em batelada

Valores testados para cada fator						
Fatores	Unidade	Axial	Nível	Ponto	Nível	Axial
		inferior (-1,68)	inferior (-1)	central (0)	superior (+1)	superior (+1,68)
Nitrato	mg L ⁻¹	95,9±2,1	124±1,6	180±8,2	250±10,2	250±10,2
Diclofenaco	µg L ⁻¹	57±2,0	73±8,1	78±2,3	100±4,7	146,3±22,3
Etanol	mg L ⁻¹	100,5±25	133±16	183±4,8	223,5±12,4	278,9±25,3

A seleção das faixas de concentrações adotadas no DCCR (Tabela 4.7) foi conduzida conforme a revisão dos trabalhos de Gusmão et al. (2007), Campanha et al. (2015) e Andrade et al. (2017). Tais autores demonstraram o potencial desnitrificante da biomassa aeróbia, cuja fonte do inóculo foi semelhante à aplicada nesta pesquisa, além da capacidade de suportar altos teores de tóxicos, como o surfactante aniônico LAS, na presença do etanol como co-substrato (ANDRADE et al., 2017a).

Ademais, as concentrações do diclofenaco foram previstas conforme os níveis quantificados e recorrentes em esgoto sanitário (CAMPANHA et al., 2015).

A equação empírica de segunda ordem foi utilizada para descrever a remoção de diclofenaco (Y resposta) de acordo com as variáveis independentes (nitrato, etanol e diclofenaco) como apresentado na Equação 4.1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + X_1 X_2 + X_2 X_3 + X_1 X_3 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Sendo:

Y = resposta prevista;

$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ e β_3 = coeficientes lineares;

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ = coeficientes quadráticos;

X_1, X_2, X_3 = variáveis independentes.

Tabela 4.5. Condições do DCCR previstas para remoção de diclofenaco.

Ensaio	Variáveis nominais			Variáveis reais		
	Nitrato (X ₁)	Diclofenaco (X ₂)	Etanol (X ₃)	Nitrato (mg L ⁻¹)	Diclofenaco (µg L ⁻¹)	Etanol (mg L ⁻¹)
1	130	60	130	124,3±1,6	73±8,1	133,3±16,7
2	230	60	130	227,8±5,5	78±3,6	132,8±9,1
3	130	100	130	128,4±5,1	101±13,6	138,5±8,1
4	230	100	130	200,5±5,9	104±5,6	158,2±4,5
5	130	60	230	131,2±7,1	75±2,5	243±10,2
6	230	60	230	226,3±7,3	76±2,7	223,5±12,4
7	130	100	230	135,2±2,1	100±4,7	230±6,0
8	230	100	230	225,8±7,9	112±2,8	247,5±7,8
9	95,91	80	180	95,9± 2,1	101,5±0,7	162,4±12,5
10	264	80	180	250±10,2	96±1,1	160,0±6,9
11	180	46,36	180	176,6±3,7	57±2,0	158,8±5,3
12	180	113,64	180	184,2±2,4	146,3±22,3	203,0±7,8
13	180	80	95,91	197,7±5,4	95±8,6	100,5 ±25,3
14	180	80	264	179,0±2,5	96±5,2	278,9±13,2
15	180	80	180	180,5±8,2	78±2,3	183,5±4,8
16	180	80	180	186,7±4,9	80,7±4,1	178,8±9,2
17	180	80	180	180,5±8,2	73,3±3,6	183,5±28,7
Reator otimizado	180	80	180	176,6 ±5,2	76,8±3,7	180±2,5

Os efeitos das concentrações iniciais de nitrato, etanol e diclofenaco foram avaliados a partir da eficiência de remoção do diclofenaco ao final de cada ensaio conforme a equação 4.2.

$$\text{Remoção DCF (\%)} = \frac{\text{DCF inicial} - \text{DCF final}}{\text{DCF inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Sendo:

DCF_{inicial} = concentração inicial do diclofenaco ($\mu\text{g L}^{-1}$)

DCF_{final} = concentração final do diclofenaco ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Os parâmetros foram considerados significativos quando o nível de significância (p) fosse abaixo de 0,05. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das variáveis independentes (nitrato, DCF, etanol) a partir da obtenção do valor de $F_{\text{calculado}}$ e da sua comparação com o F_{tabelado} .

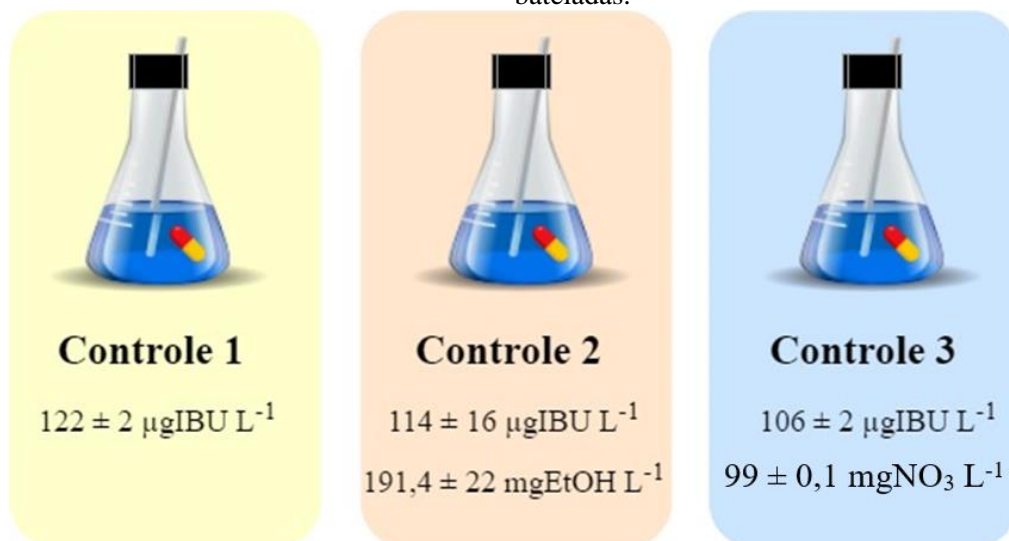
Após análise dos resultados obtidos via DCCR, realizou-se a validação das condições ótimas previstas via superfície de respostas. Para tanto, foram avaliados $176,6 \pm 4,3 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $76,8 \pm 3,7 \mu\text{g DCF L}^{-1}$ e $180 \pm 2,5 \text{ mg EtOH L}^{-1}$. A validação foi feita em reatores em frascos *Erlenmeyer* de 1,0 L de volume total, sendo 330 mL de volume reacional, em triplicata, e em atmosfera Argônio 100% por 10 min.

4.5.3 Ensaios em reatores em batelada com ibuprofeno

4.5.3.1 Avaliação da remoção do ibuprofeno em reatores em bateladas em condições controles

A fim de analisar o potencial do inóculo de tolerância e degradação do ibuprofeno, foram conduzidas três condições experimentais preliminares em reatores em bateladas, sendo todas com ibuprofeno, etanol e nitrato, conforme Figura 4.3.

Figura 4.3. Esquema experimental para avaliação da remoção de ibuprofeno em reatores em bateladas.



As três condições controles foram realizadas com meio *Dolfin* e $1,0 \text{ gSSV L}^{-1}$ de inóculo, conduzidas em reatores de frascos *Erlenmeyer* de $1,0 \text{ L}$ de volume total, sendo 330 mL de volume reacional, em triplicata, em atmosfera Argônio 100% por 10 min. Durante o experimento, os reatores foram mantidos à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação de 100 rpm.

Alíquotas de $2,0 \text{ mL}$ foram coletadas dos reatores Controle 1 e 2 para análise temporal da remoção de matéria orgânica, enquanto no Controle 3 foi analisado a cada 1 hora a remoção de nitrato. Para todas as condições, o ibuprofeno foi quantificado ao início e ao final dos ensaios, da mesma maneira que se prosseguiu às análises de ácidos orgânicos voláteis.

4.5.3.2 Avaliação da remoção do ibuprofeno em reatores em bateladas

Para análise da degradação do ibuprofeno na presença do acceptor de elétrons e do co-substrato foram conduzidas 19 condições com concentrações variadas de nitrato (mg L^{-1}), ibuprofeno ($\mu\text{g L}^{-1}$) e etanol (mg L^{-1}) descritas por um delineamento do composto central rotacional (DCCR) em 3 níveis (-1; 0; +1), acrescidos dos três pontos axiais (-1,42; +1,42) e de 5 repetições no ponto central (Tabela 4.8), totalizando 51 ensaios.

A configuração do planejamento experimental para os 3 fatores foi feita com 8 combinações possíveis, acrescidos dos 6 pontos axiais e de 5 repetições no ponto central, totalizando 19 ensaios (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 Coeficientes adotados no DCCR para o ensaio de remoção do ibuprofeno.

Valores testados para cada fator						
Fatores	Unidade	Axial inferior (-1,68)	Nível inferior (-1)	Ponto central (0)	Nível superior (+1)	Axial superior (+1,68)
Nitrato	mg L^{-1}	$95,9 \pm 5,0$	$130 \pm 13,2$	$180 \pm 13,9$	$241,5 \pm 4,6$	$264 \pm 6,0$
Ibuprofeno	$\mu\text{g L}^{-1}$	$41 \pm 5,6$	$67,2 \pm 3,9$	$82,8 \pm 0,8$	$100 \pm 1,2$	$122,8 \pm 5,0$
Etanol	mg L^{-1}	$95,3 \pm 21,9$	$110,7 \pm 15,6$	180 ± 11	$226 \pm 0,1$	$233 \pm 0,2$

A superfície de resposta e análise dos parâmetros (Teste F) foram realizados via programa *Statistica* 10 (StatSoftInc, 2014, USA). As concentrações das variáveis avaliadas foram previamente definidas segundo a literatura em 130, 180 e 230 mg L⁻¹ para nitrato e etanol ((GUSMÃO et al., 2007; MAINTINGUER et al., 2013; ANDRADE et al., 2017a) e 60, 80 e 100 µg L⁻¹ para ibuprofeno (CAMPANHA et al., 2015), conforme Tabela 4.9.

A equação quadrática polinomial foi utilizada para descrever a remoção de ibuprofeno (Y resposta) de acordo com as variáveis independentes (nitrato, ibuprofeno e etanol) como apresentado na Equação 4.3.

Os cálculos da falta de ajuste e dos efeitos de interação das variáveis independentes foram calculados a nível de confiança de 0,10.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + X_1 X_2 + X_2 X_3 + X_1 X_3 \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Sendo:

Y = resposta predita;

$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ e β_3 = coeficientes lineares;

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ = coeficientes quadráticos,

X_1, X_2, X_3 = variáveis independentes.

Nitrato, etanol e ibuprofeno foram adicionados segundo as concentrações preditas ao planejamento experimental para cada condição listada na Tabela 4.7. A partir da análise dos 19 ensaios preditos via DCCR, foi possível obter a superfície resposta (Equação 4.4) e ajuste da equação polinomial de segunda ordem (Equação 4.3). Em seguida, condições ótimas do planejamento foram analisadas e realizou-se a validação do DCCR em reator com a condição otimizada.

A superfície de resposta e análise dos parâmetros (Teste F) foram realizados com auxílio do programa *Statistica* 10 (StatSoftInc, 2014, USA). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das variáveis (ibuprofeno, nitrato e etanol) no ajuste da equação polinomial de segunda ordem.

$$\text{Remoção IBU (\%)} = \frac{\text{IBU inicial} - \text{IBU final}}{\text{IBU inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Sendo,

IBU_{inicial} = concentração inicial do ibuprofeno

IBU_{final} = concentração final do ibuprofeno

Tabela 4.7 Condições via DCCR dos ensaios em reatores em batelada com ibuprofeno.

Ensaio	Variáveis nominais (X)			Variáveis reais (X)		
	NO ₃	IBU	EtOH	NO ₃	IBU	EtOH
	(mg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(X ₁ , mg L ⁻¹)	(X ₂ , µg L ⁻¹)	(X ₃ , mg L ⁻¹)
1	130	100	230	130,0±13,9	82±13,1	210,0±8,2
2	130	60	130	130,0±13,2	41±5,6	144,6±2,4
3	230	60	230	260,2±2,6	49,3±2,7	207,7±25,6
4	230	100	130	261,8±7,7	82,8±0,8	158,2±31,7
5	130	100	130	134,2±2,9	100±1,2	130,5±1,5
6	230	100	230	216,0±26,4	100±0,5	226,8±0,1
7	230	60	130	241,5±4,6	97,7±5,7	146±3,6
8	130	60	230	140,0±3,8	85,2±7,9	213±2,5
9	180	46,36	180	143,0±23,2	67,2±3,9	203±6,7
10	95,91	80	180	97,5±5,0	109,9±1,6	180,8±11
11	264	80	180	264,0±6,0	93,8±9,1	110,7±15,6
12	180	113,64	180	168,6±6,8	122,8±5,0	98,4±0,1
13	180	80	264	165,6±3,5	95,7±10,3	233,3±0,2
14	180	80	95,91	160,2±13,0	91,3±1,7	95,3±21,9
15	180	80	180	180,0±13,9	105,2±6,8	157,1±32,6
16	180	80	180	177±63,6	90,5±2,1	182±5,3
17	180	80	180	174,4±1,7	108,7±11	179,8±9,8
18	180	80	180	192±7,7	117±2,1	151,7±4,2
19	180	80	180	166,3±1,6	110±4,2	197,2±9,7

A validação foi conduzida em reatores em frascos *Erlenmeyer* de 1,0 L de volume total, sendo 330 mL de volume reacional, em triplicata, e em atmosfera Argônio 100% por 10 min. Os ensaios foram realizados com 1,0 gSSV L⁻¹ de inóculo de lodos ativados, 300 mL de meio de cultura com as concentrações previstas de cada variável no DCCR. A validação do planejamento foi feita nas condições a partir de 100,9±0,1 mg L⁻¹ de nitrato, 104,2±2,3 µg L⁻¹ de ibuprofeno e 110,6±15,6 mg L⁻¹ de etanol.

4.6 Reator de leito fluidificado

O reator de leito fluidificado (RLF) em escala aumentada (Figuras 4.4 e 4.5) foi construído em Policloreto de Vinila (PVC) e acrílico com 0,20 m de diâmetro interno, 4 m de altura e volume de 0,128 m³. O RLF foi instalado na Estação de Tratamento de Esgoto de São Carlos – SP (SAAE – Serviço Autônomo de Água e Esgoto, ETE-Monjolinho) e mantido em temperatura ambiente (30±5°C). Na parte inferior foi instalado um distribuidor para garantir a uniformidade do fluxo ascensional, cuja velocidade foi de 1,2 cm s⁻¹. Além disso, a areia foi utilizada como meio suporte para adesão do consórcio de microrganismos. Ao longo do corpo do reator foram alocados pontos de amostragem, por onde foi possível a coleta da biomassa para análise da biologia molecular.

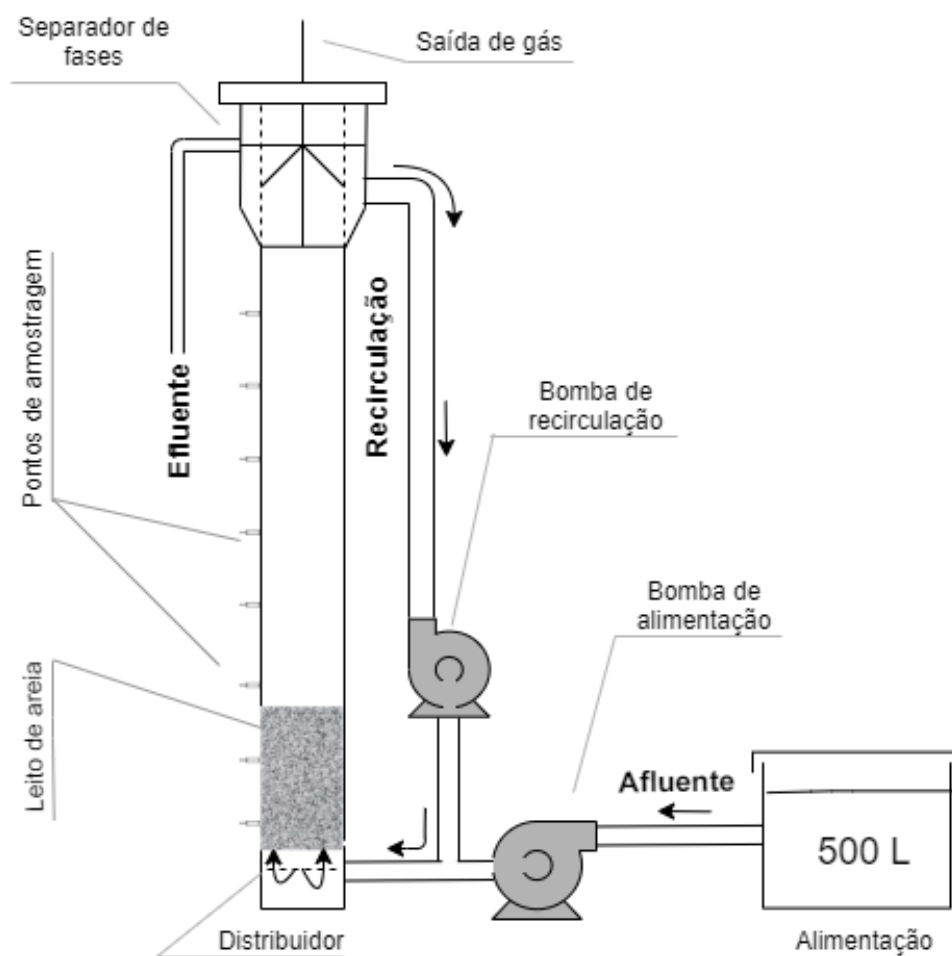
O tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado durante a operação do RLF foi de 18 e 12 horas, cujas vazões de alimentação foram de 7,11 L h⁻¹ e 10,66 L h⁻¹ respectivamente. Estas vazões foram controladas via bomba peristáltica de precisão, ProMinent Brasil®, Modelo CONB0223PP1000A101. Os parâmetros operacionais do RLF estão incluídos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Parâmetros operacionais do reator de leito fluidificado

Altura do leito (cm)	Expansão do leito (%)	Volume do leito (L)	Q _{rec} (L h ⁻¹)	V _{mf} (L h ⁻¹)	Velocidade superficial (m s ⁻¹)
110	10	140	2.723	28,8	0,024

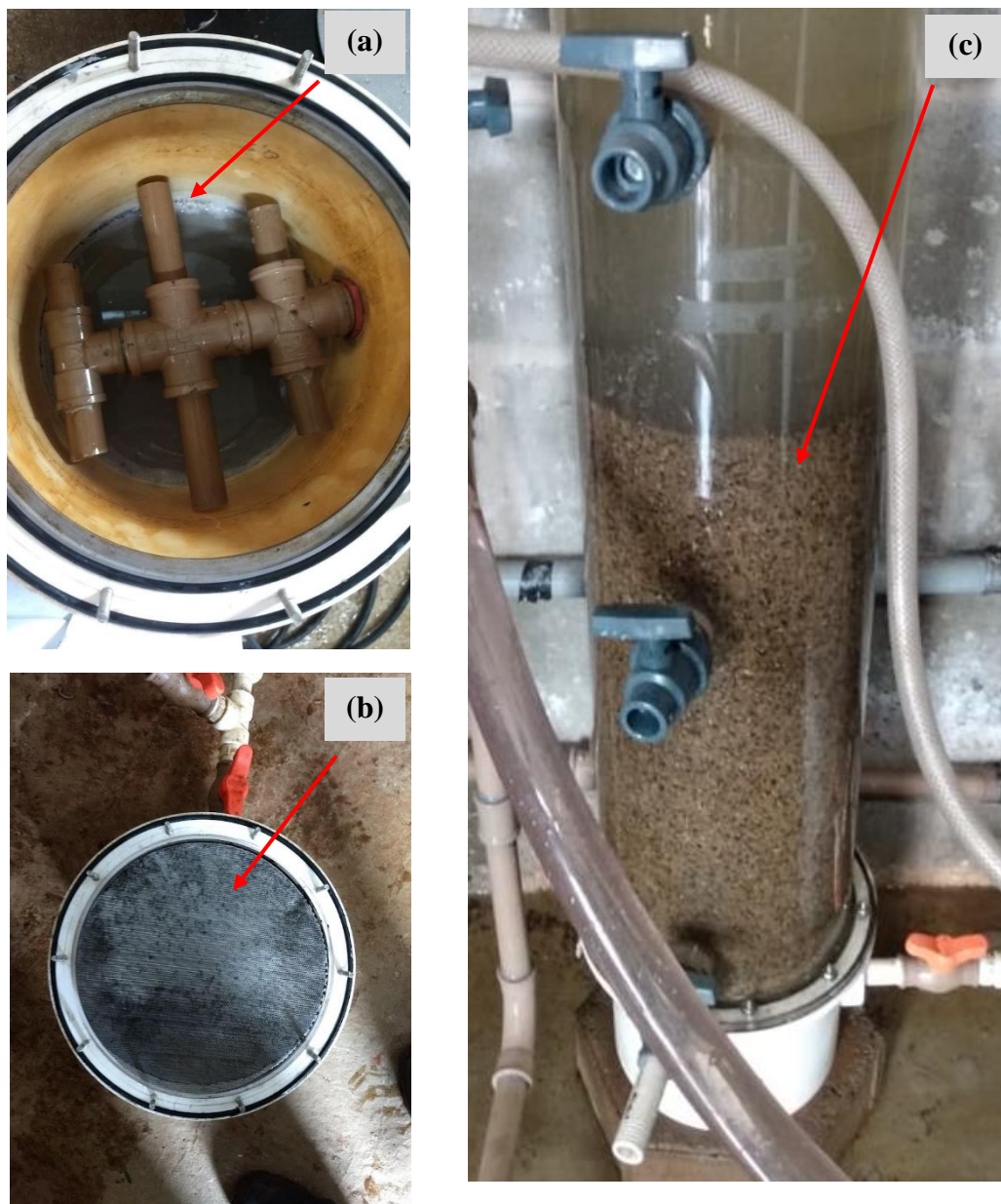
Q_{rec} – Vazão de recirculação; V_{mf} – velocidade mínima de fluidificação

Figura 4.4. Configuração do RLF



Areia foi usada como material suporte com 26,78 Kg e diâmetro entre 1,41 e 1,68 mm. A seleção do material foi feita por peneiramento de 12 e 14 *mesh* em separação manual. Para a remoção de impurezas e formação de maior rugosidade na superfície dos grãos de areia, o material foi submetido a um tratamento ácido, sendo este submerso em solução de ácido fluorídrico (HF) em água destilada, 20% em volume (1:4) por 20 minutos e em seguida, a areia foi levada à estufa de secagem (105°C) por 24 horas, conforme a metodologia descrita por Silva (1985).

Figura 4.5. Fotografias do RLF: (a) Sistema distribuidor de fluxo ascendente, (b) Tela de proteção do leito na região inferior do RLF e (c) Leito do reator com areia



Fonte: a autora

4.6.1 Esgoto sanitário

Um tanque de polietileno com volume de 500 L foi utilizado para armazenar a alimentação do reator, a qual consistiu em esgoto sanitário captado após o tratamento preliminar da Estação de Tratamento de Esgoto de São Carlos – SP (Figura 4.6). A alimentação foi realizada por acionamento manual de uma bomba centrífuga para a captação e recalque do efluente, a temperatura foi lida no mesmo horário da alimentação

(12h). Para a alimentação do reator, foi preparada solução estoque em metanol (99%) com 24 g L^{-1} de diclofenaco e 36 g L^{-1} de ibuprofeno. Tais soluções foram adicionadas em todas as fases operacionais, com exceção da fase I.

Figura 4.6 Configuração da alimentação do RLF: (a) Caixa de alimentação, (b) Bomba centrífuga de alimentação e (c) Tratamento preliminar da ETE





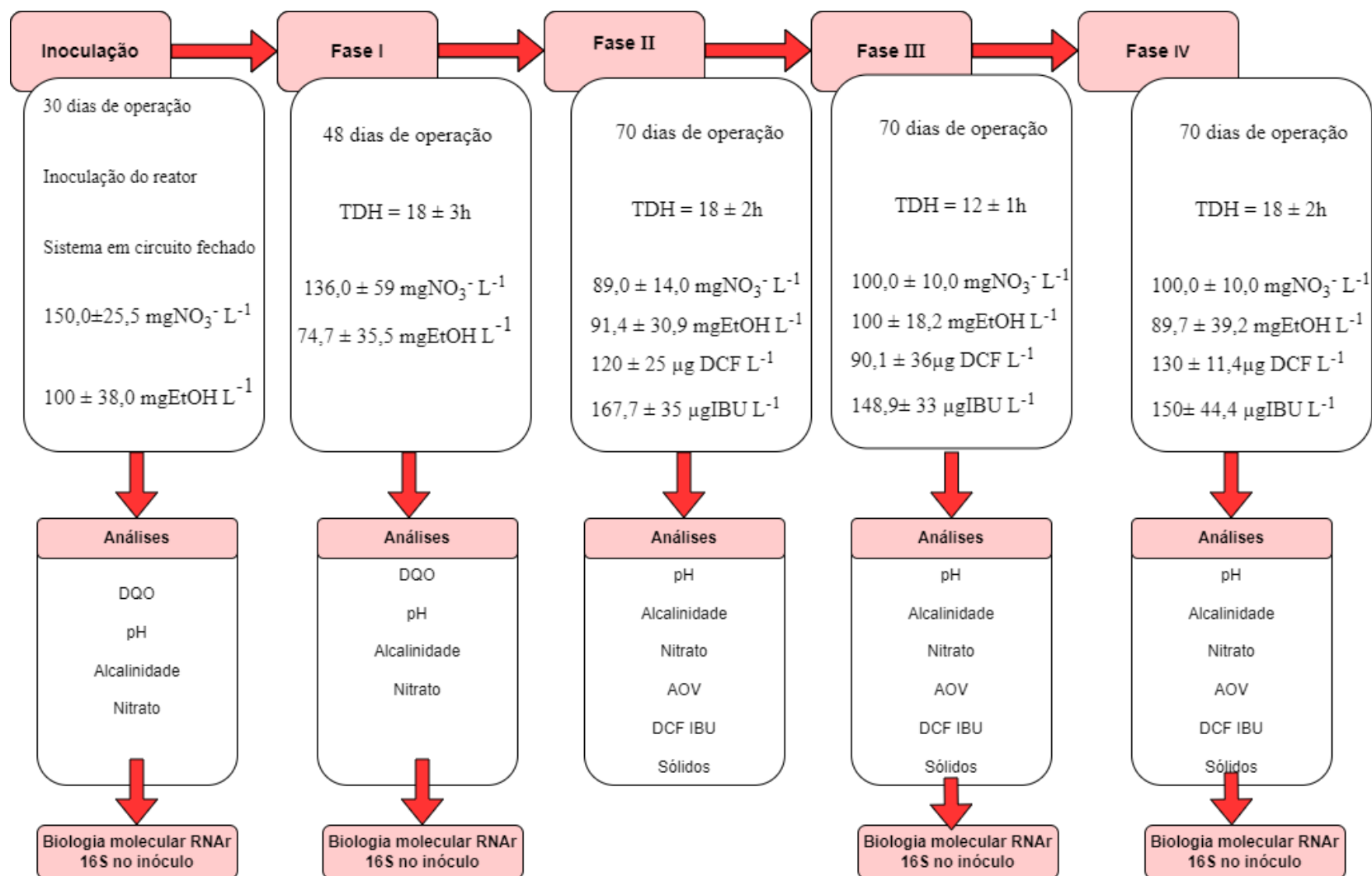
Fonte: a autora

4.6.2 Operação do RLF

4.6.2.1 Fases de operação do reator contínuo

O RLF foi operado em 4 fases distintas, além do período de inoculação (Figura 4.7), conforme descrito a seguir: (I) tempo de detenção hidráulica (TDH) de 18 ± 3 h com etanol ($74,7 \pm 35,5 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrato ($136,0 \pm 59 \text{ mg L}^{-1}$); (II) TDH de 18 ± 2 h com etanol ($91,4 \pm 30,9 \text{ mg L}^{-1}$), nitrato ($89 \pm 14 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($120 \pm 25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($167,7 \pm 35 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (III) TDH de 12 ± 1 h com etanol ($100 \pm 18,2 \text{ mg L}^{-1}$), nitrato ($100 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($90,1 \pm 36 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($148,9 \pm 33 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (IV) TDH de 18 ± 2 h com etanol ($89,7 \pm 39,2 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($185,6 \pm 29,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($150 \pm 44,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) afluente, respectivamente.

Figura 4.7. Fluxograma experimental da operação do RLF.

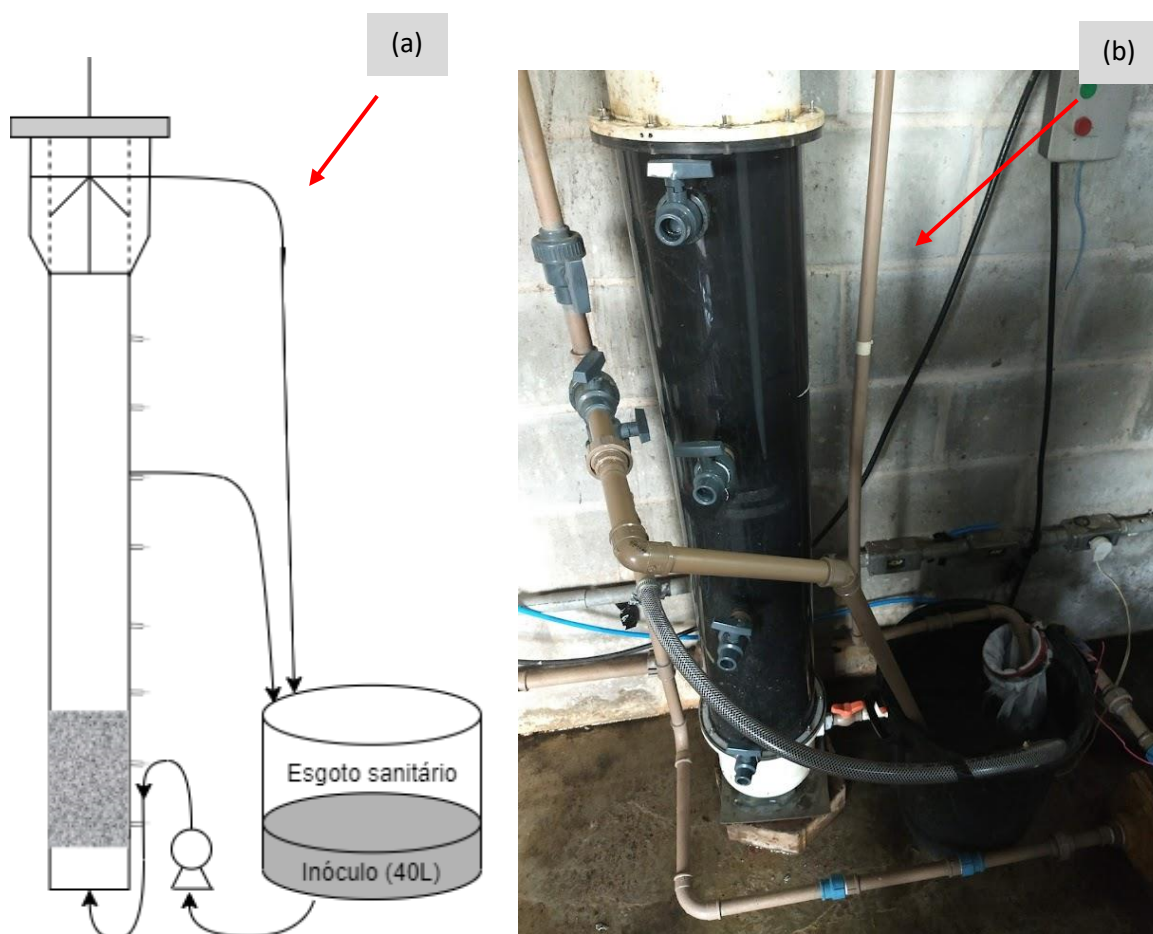


4.6.2.2 Inoculação

A biomassa utilizada como inóculo do reator de leito fluidificado foi proveniente de um sistema de lodos ativados em operação destinado ao tratamento de esgoto sanitário da Indústria de Motores Volkswagen de São Carlos/SP. Tal biomassa era constituída por ampla diversidade de microrganismos e bastante utilizada em diversas pesquisas de remoção de micropoluentes orgânicos, tais como surfactantes (ANDRADE et al., 2020; MACEDO et al., 2020), BTEX (GUSMÃO et al., 2006) e antibióticos (OLIVEIRA et al., 2019) conduzidos no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos.

A imobilização da biomassa foi feita em circuito fechado com recirculação do esgoto sanitário e 30 L de lodo (aproximadamente 10% do volume total do reator) com 12,0 g STV L⁻¹ durante 30 dias em temperatura aproximadamente de 30±3°C (Figura 4.8).

Figura 4.8. Circuito de Inoculação do RLF: (a) Desenho esquemático e (b) Fotografia do leito do RLF



Neste período, foi adicionado $100\pm 30\text{ mg L}^{-1}$ de nitrato, na forma de nitrato de sódio (NaNO_3) ($137,3\text{ mg L}^{-1}$) e $100\pm 48\text{ mg L}^{-1}$ de etanol em esgoto sanitário captado pós-tratamento preliminar (gradeamento grosso e fino e desarenação) da ETE de São Carlos-SP (Brasil) ao volume reacional (150 L) com teor de matéria orgânica de $400,0\pm 100\text{ mgDQO L}^{-1}$.

A cada 24 horas da alimentação em circuito fechado, foi feita a drenagem de 30% do volume do reator e seguiu-se com a suplementação da alimentação (esgoto sanitário, nitrato e etanol). Após a inoculação, seguiu-se a fase I em circuito aberto (70 dias) alimentado com esgoto sanitário, suplementado com nitrato e etanol em TDH de 12 h para promover o enriquecimento e seleção das populações desnitrificantes.

4.6.2.3 Etapas de operação

Após o período de inoculação por 30 dias, prosseguiu-se com a fase I em sistema contínuo em TDH de 18 ± 3 horas, cuja alimentação foi com esgoto sanitário, acrescido de $136\pm 59\text{ mg L}^{-1}$ de nitrato e $74,7\pm 35,5\text{ mg L}^{-1}$ de etanol, sem fármacos.

As demais fases de operação (Fase I, II e III) seguiram com $100\pm 40\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco e $150\pm 40\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno, com variação do TDH e presença de fontes adicionais de nitrogênio e carbono. O tempo de operação e as condições operacionais de cada fase estão descritos na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Fases de operação do reator RLF durante o período de inoculação (30 dias) e fases I-IV (70 dias).

Fases	TDH (h)	Temperatura efluente (°C)	NO_3^- (mg L^{-1})	DCF ($\mu\text{g L}^{-1}$)	IBU ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EtOH (mg L^{-1})	DQO (mg L^{-1})
Inoculação	-	30 ± 3	$136 \pm 25,5$	-	-	100 ± 38	$330,0 \pm 25,9$
Fase I	18 ± 3	30 ± 3	136 ± 59	-	-	$74,7 \pm 35,5$	310 ± 54
Fase II	18 ± 2	32 ± 3	89 ± 14	120 ± 25	$167,7 \pm 35$	$91,4 \pm 30,9$	364 ± 70
Fase III	12 ± 1	35 ± 3	100 ± 10	$90,1 \pm 36$	$148,9 \pm 33$	$100 \pm 18,2$	360 ± 49
Fase IV	18 ± 2	38 ± 2	13 ± 2	$185,6 \pm 29,9$	$150 \pm 44,4$	$89,7 \pm 39,2$	438 ± 74

Nota: TDH: Tempo de Detenção Hidráulica. NO_3^- : Nitrato. DCF: diclofenaco. IBU: ibuprofeno. EtOH: etanol.

4.7 Métodos analíticos e cromatográficos

O desempenho do reator foi avaliado a partir de análises diárias de monitoramento analítico das amostras líquidas do afluente e efluente, a partir dos seguintes parâmetros: pH, nitrato, demanda química de oxigênio total (DQOt) e solúvel (DQOs), teor de sólidos suspensos voláteis (SSV), concentração de AOV e de solventes, alcalinidade parcial e intermediária. As frequências e as metodologias de tais análises foram elucidadas na Tabela 4.10.

As análises de pH, nitrato, sólidos e DQO foram realizadas conforme os protocolos descritos no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2020). Na análise de DQO solúvel, as amostras foram previamente centrifugadas (5000 rpm, 5 minutos) e filtradas em membranas de 0,45µm. Na determinação da série de sólidos suspensos, as amostras afluente e efluente foram filtradas em membranas de 1,2 µm.

A alcalinidade parcial e intermediária foi determinada segundo o protocolo descrito por Ripley et al. (1986), além da determinação titulométrica de ácidos orgânicos totais conduzida pela metodologia desenvolvida por Dillalo e Albertson (1961). Previamente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min para a eliminação da interferência de sólidos suspensos.

As concentrações dos ácidos orgânicos voláteis (ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico) e solventes (n-butanol, metanol e etanol) foram determinadas segundo Adorno et al. (2014). As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso modelo GC2010 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna HP-INNOWAX (comprimento de 30m, diâmetro interno de 0,25mm e espessura do filme de 0,25 µm). Previamente à detecção, as amostras foram preparadas em frasco-padrão de vidro (10 mL, amostrador COMBI-PAL) com adição de 1 g de cloreto de sódio (NaCl), 2 mL de amostra, 70 µL de solução de isobutanol (1g L⁻¹), 100 µL de ácido crotônico (700mg L⁻¹) e 200 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (2M).

Para a quantificação do surfactante LAS, como parte de monitoramento e caracterização do esgoto sanitário, frações líquidas afluente e efluente ao RLF foram determinados por HPLC com padrão Sigma Aldrich CAS 25115-30-0 com 99% de grau de pureza. As condições cromatográficas estão apresentadas na Tabela 4.11 de acordo com metodologia de Duarte et al. (2006).

Tabela 4.5 Análises físico-químicas dos ensaios do reator contínuo.

Parâmetro	Método	Frequência de análise (na semana)	Referência
Ácidos orgânicos voláteis + solventes (mg L ⁻¹)	Cromatografia gasosa	2x	Adorno et al. (2014)
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Titulométrico	3x	Ripley et al. (1956)
DQO bruta e filtrada (mg L ⁻¹)	Digestão/Espectrofotometria	3x	APHA/AWW A/WEF (2012)
Nitrato (mg L ⁻¹)	Espectrofotometria	3x	APHA/AWW A/WEF (2012)
pH	Potenciometria	3x	APHA/AWW A/WEF (2012)
Sólidos totais (g L ⁻¹)	Gravimetria/Calcinação	3x	APHA/AWW A/WEF (2012)
Fármacos (DCF e IBU)	Cromatografia líquida	2x	Campanha (2015)
Vazão (L h ⁻¹)	Volumetria	Diária	-

Tabela 4.6. Condições cromatográficas para detecção e quantificação do LAS

Condições cromatográficas	
Coluna	C-8 fase reversa (Supelco)
Eluente A	Metanol
Eluente B	Solução NaClO ₄ em água ultra pura (0,075 mol L ⁻¹)
Fluxo	0,50 mL min ⁻¹
Detector	Espetrômetro de massa no modo SRM
Temperatura da coluna	35°C

Fonte: Duarte et al. (2006)

A concentração dos fármacos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao detector de massa em metodologia desenvolvida e validada por Campanha (2015). As soluções padrões utilizadas, tanto para extração dos fármacos no inóculo, quanto para quantificação dos mesmos em amostras líquidas forma com alto grau de pureza (>96%) e procedentes da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Os compostos isotopicamente lábeis foram procedentes da CDN Isotopes (Quebec, Canadá). Os solventes metanol e acetona de grau HPLC foram adquiridos da J.T. Baker (Ecapetec, México) e Mallinkrodt (Phillipsburg, EUA), respectivamente. Ácido fórmico (98%) e hidróxido de amônio de grau HPLC foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Schweiz, Suíça).

As amostras líquidas coletadas nos ensaios em bateladas e na operação do RLF foram previamente armazenadas a 10°C e preparadas em vials (2,0 mL) com adição do padrão interno (1 ppm) e metanol HPLC. Posteriormente, foram filtradas em membranas de PTFE Hidrofílico 0,22 µm com pré-filtro de Polipropileno (PP). Maiores especificidades dos limites de detecção e das condições cromatográficas podem ser consultadas em Campanha et al. (2015).

Quanto à esta metodologia, a detecção e quantificação do diclofenaco e ibuprofeno nas amostras foram realizadas em HPLC com o 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). A eluição de gradiente foi iniciada com 5% do eluente 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). As condições cromatográficas estão dispostas na Tabela 4.12.

O Espectrômetro de Massa (MS) (TQD, Waters, Reino Unido), utilizado na determinação do diclofenaco e ibuprofeno, foi equipado com uma fonte de íon eletropulverizador (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 monitoramento 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).

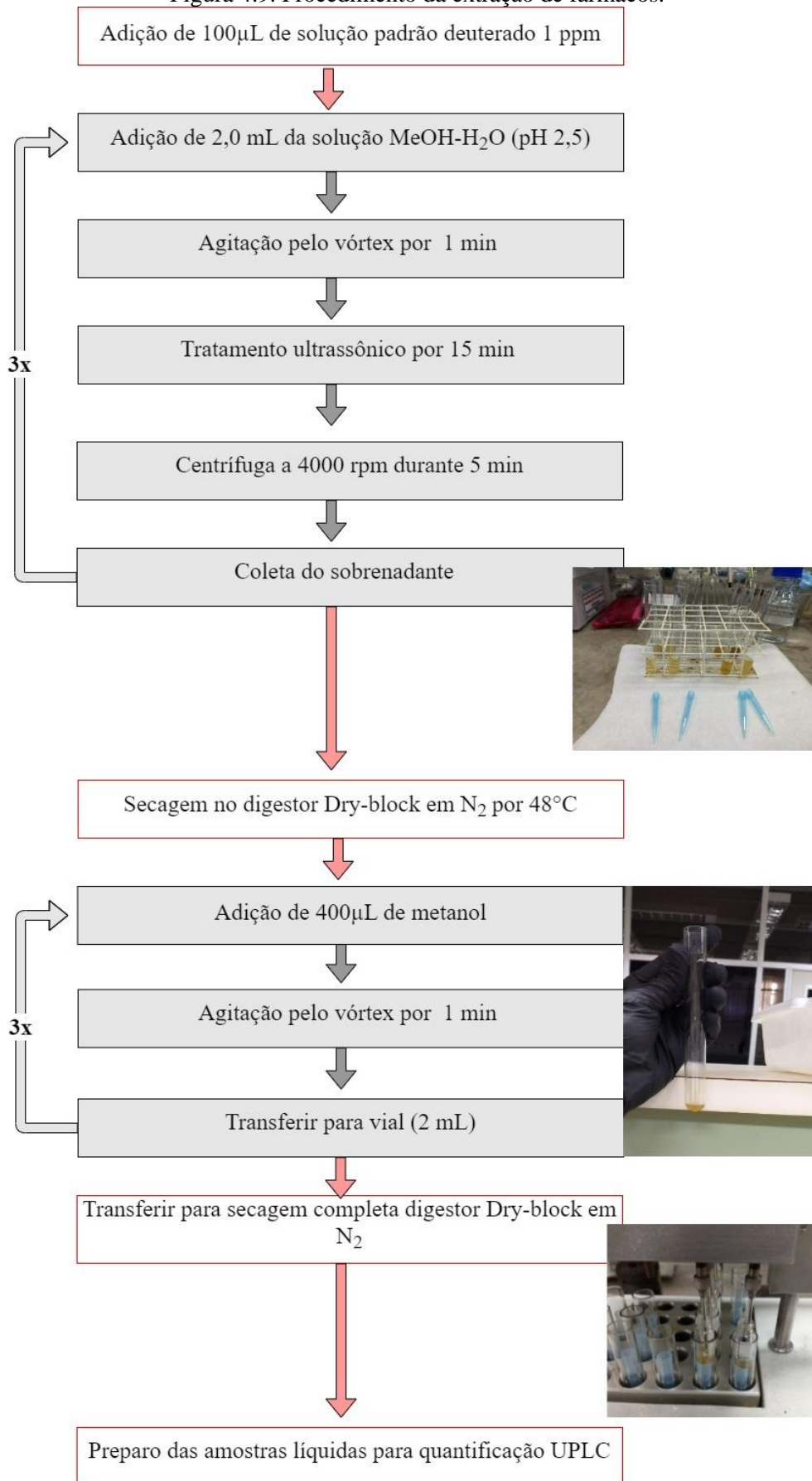
Tabela 4.12 Condições cromatográficas para quantificação dos fármacos.

Condições cromatográficas	
Coluna	Fase reversa Acquity UPLC BEH C18
Eluente A	Água Milli-Q + 0,05% de hidróxido de amônio (25% v/v)
Eluente B	Metanol
Fluxo	0,45 mL min ⁻¹
Detector	Espetrômetro de massa no modo SRM
Temperatura da coluna	40°C
Temperatura da amostra	10°C
Linearidade	200 a 2000 ng L ⁻¹ para água e esgoto
Limite de detecção	0,08 ng L ⁻¹

Fonte: Campanha et al (2015)

A extração dos fármacos no lodo foi realizada conforme metodologia validada por Gago-Ferrero et al. (2015), cujo procedimento do preparo das amostras está descrito na Figura 4.9. Ao final da operação dos reatores em batelada, o inóculo foi centrifugado a 9.000 rpm e armazenado a -20°C. A biomassa aderida na areia do reator de leito fluidificado foi extraída por agitação mecânica. O material foi submetido a centrifugação nas mesmas condições descritas para as amostras dos reatores em bateladas. As amostras foram totalmente secas em estufa a 40°C por no mínimo 48 horas, e em seguida, foi triturada com pistilo e realizados os testes de adição e recuperação com adição da solução padrão deuterado (100 ppb – 10 ng g⁻¹) e com a solução mix DCF + IBU a 100 ppb com 50 ng g⁻¹.

Figura 4.9. Procedimento da extração de fármacos.



4.8 Cálculos

4.8.1 Parâmetros cinéticos dos reatores em bateladas

Para a avaliação da remoção do nitrato em reatores em bateladas na presença de diclofenaco, os resultados em triplicatas foram tratados pela média de cada condição por meio do software OriginPro 9.0 e ajustados à equação de decaimento exponencial monofásico “Fit Exponential Decay” (ExpDec 1 model) (Equação 4.5).

$$y = y_0 + A_1 e^{-x/t_1} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

Sendo:

y = concentração final de nitrato (mg L^{-1})

y_0 = concentração inicial de nitrato (mg L^{-1})

A = uma constante de amplitude

t = tempo de decaimento (h).

Nos ensaios em bateladas na presença do ibuprofeno, os resultados de nitrato foram tratados pela média dos valores obtidos por triplicatas em cada condição por meio do software OriginPro 9.0. As concentrações de nitrato quantificadas em intervalos de 1 hora do experimento foram ajustadas à equação sigmóide de Boltzmann (Equação 4.6).

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Sendo:

A_1 = Concentração inicial de nitrato (mg L^{-1});

A_2 = Concentração final de nitrato (mg L^{-1});

x_0 = tempo correspondente ao centro da sigmóide (h^{-1});

dx = velocidade de decaimento;

4.8.2 Parâmetros de monitoramento

As variáveis respostas do desempenho do reator de leito fluidificado incluíram: eficiência de remoção de matéria orgânica bruta e solúvel ($Ef_{DQO} \%$), eficiência de remoção

de nitrato (Ef_{NO_3} %) e eficiência de remoção de fármacos (Ef_{DCF} % Ef_{IBU} %). O equacionamento para o cálculo destas variáveis está apresentado na Tabela 4.13.

Tabela 4.73. Cálculos utilizados para análises de monitoramento.

Variável resposta	Unidade	Equação	Parâmetros de cálculo
Eficiência de remoção de DQO	%	$Ef_{DQO} = \frac{DQO_{af} - DQO_{ef}}{DQO_{af}}$ (Eq. 4.7)	DQO af: DQO afluente DQO ef: DQO efluente
Eficiência de remoção de nitrato	%	$Ef_{NO_3} = \frac{NO_{3af} - NO_{3ef}}{NO_{3af}}$ (Eq. 4.8)	NO ₃ af: Concentração afluente de nitrato (mg L ⁻¹) NO ₃ ef: Concentração efluente de nitrato (mg L ⁻¹)
Eficiência de remoção de diclofenaco	%	$Ef_{DCF} = \frac{DCF_{af} - DCF_{ef}}{DCF_{af}}$ (Eq. 4.9)	DCF af: Concentração afluente de diclofenaco (µg L ⁻¹) DCF ef: Concentração efluente de diclofenaco (µg L ⁻¹)
Eficiência de remoção de ibuprofeno	%	$Ef_{IBU} = \frac{IBU_{af} - IBU_{ef}}{IBU_{af}}$ (Eq. 4.10)	IBU af: Concentração afluente de ibuprofeno (µg L ⁻¹) IBU ef: Concentração efluente de ibuprofeno (µg L ⁻¹)
Vazão de alimentação	L h ⁻¹	$Q = \frac{V}{t}$ (Eq. 4.5)	V: Volume do efluente (L) t: Tempo de medição para a coleta do volume (h)

4.8.3 Balanço de massa

Diclofenaco e ibuprofeno foram extraídos da biomassa dos reatores em bateladas ao final da operação conforme metodologia validada e descrita por Gago-Ferrero et al. (2015) e determinação via UPLC/MS-MS. O balanço de massa foi realizado conforme as equações 4.12 a 4.15.

$$X_{\text{rem}} = X_{\text{inicial}} - X_{\text{final}} \quad (4.12)$$

Sendo:

X_{rem} = massa do diclofenaco removido (μg);

X_{inicial} = massa do diclofenaco adicionado no início das bateladas (μg);

X_{final} = massa do diclofenaco no final de operação das bateladas (μg).

$$X_{\text{rem}} = X_{\text{inicial}} - (X_{\text{final}} + X_{\text{ads}}) \quad (4.13)$$

Sendo:

X_{rem} = massa do diclofenaco removido por processo biológico (μg);

X_{inicial} = massa do diclofenaco adicionado no início das bateladas (μg);

X_{final} = massa do diclofenaco no final de operação das bateladas (μg);

X_{ads} = massa do diclofenaco adsorvido no lodo das bateladas (μg).

$$X_{\text{rem}} = X_{\text{inicial}} - X_{\text{final}} \quad (\text{Eq. 4.14})$$

Sendo:

X_{rem} = massa do ibuprofeno removido (μg);

X_{inicial} = massa do IBU adicionado no início das bateladas (μg);

X_{final} = massa do IBU no final de operação das bateladas (μg);

$$X_{\text{deg}} = X_{\text{inicial}} - (X_{\text{final}} + X_{\text{ads}}) \quad (\text{Eq. 4.15})$$

Sendo:

Xdeg = massa do ibuprofeno removido por processo biológico (μg);

Xinicial = massa do IBU adicionado no início das bateladas (μg);

Xfinal = massa do IBU no final de operação das bateladas (μg);

Xads = massa do IBU adsorvido no lodo das bateladas (μg);

O balanço de massa foi calculado com base na massa dos fármacos adicionada no afluente, a massa determinada no efluente e a concentração adsorvida ao meio suporte, conforme as Equações 4.16 e 4.17 para diclofenaco, 4.18 e 4.19 para ibuprofeno.

$$\text{DCF rem } (\mu\text{g}) = \text{DCF aflu } (\mu\text{g}) - \text{DCFeflu } (\mu\text{g}) \quad (\text{Eq 4.16})$$

$$\text{DCFdeg } (\mu\text{g}) = \text{DCF eflu}(\mu\text{g}) - (\text{DCFaflu} - \text{DCFads}) (\mu\text{g}) \quad (\text{Eq 4.17})$$

Sendo:

DCFrem = massa do diclofenaco removida por processos físicos e biológicos;

DCFaflu = massa do diclofenaco no afluente;

DCFeflu = massa do diclofenaco no efluente;

DCFdeg = massa do diclofenaco degradada somente por processos biológicos;

DCFads = massa do diclofenaco adsorvida na biomassa e no material suporte;

$$\text{IBU rem } (\mu\text{g}) = \text{IBU aflu } (\mu\text{g}) - \text{IBUeflu } (\mu\text{g}) \quad (4.18)$$

$$\text{IBUdeg } (\mu\text{g}) = \text{IBU eflu}(\mu\text{g}) - (\text{IBUaflu} - \text{IBUads}) (\mu\text{g}) \quad (4.19)$$

Sendo:

IBUrem = massa do ibuprofeno removida por processos físicos e biológicos;

IBUaflu = massa do ibuprofeno no afluente;

IBUeflu = massa do ibuprofeno no efluente;

IBUdeg = massa do ibuprofeno degradada somente por processos biológicos;

IBUads = massa do ibuprofeno adsorvida na biomassa e no material suporte;

4.8.4 Análises estatísticas

Para o reator de leito fluidificado, os dados de monitoramento foram avaliados via modelo paramétrico Kolmogorov Smirnov para teste de normalidade seguido pela

ANOVA. A comparação entre as médias foi feita com o teste de Tukey a 95% do nível de confiança. Todos os testes estatísticos foram realizados via software Origin 2018®.

4.9 Caracterização taxonômica

As amostras usadas na caracterização taxonômica foram coletadas no final dos ensaios dos reatores em batelada (diclofenaco e ibuprofeno) e no final das Fases I, II e IV do reator RLF. As amostras foram lavadas com solução tampão PBS x1 (NaCl 8,2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 1,05 g L⁻¹, NaH₂PO₄ + H₂O 0,35 g L⁻¹), após a centrifugação a biomassa úmida (pellet ≥ 0,5g) foi armazenado a -20°C. O DNA genômico das amostras foram extraídos com FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração (ng/μL) e pureza do DNA foram avaliadas utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), sendo a relação de absorvância (A₂₆₀/A₂₈₀) na faixa de 1,8 a 2,0, indicativa de pureza dos ácidos nucleicos. O tamanho do fragmento do DNA (> 10.000 pb) foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O sequenciamento e a bioinformática das amostras dos reatores em batelada com diclofenaco foram realizados pela empresa GenomeDX – Genética Avançada (Rio de Janeiro/RJ, Brasil). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada usando o set de primers 341F/806R (Youngseo et al., 2005) do gene 16S rRNA, região variável V3-V4 e com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). As bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando a biblioteca de DNA UltraNBNext ®Kit para *Illumina* (New England Biolabs, Ipswich, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As sequências foram montadas e filtradas (QPhred ≥ 33) para a remoção de sequências contendo bases de baixa qualidade, além das quimeras que foram detectadas (UCHIME algorithm) e excluídas. A análise das sequências foi realizada pelo software Uparse (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>), onde sequências com similaridade ≥97% foram atribuídas a mesma OTU (Operational Taxonomic Units). A classificação taxonômica das OTUs foi realizada com o RDP classifier (Ribosomal Database Project; <http://rdp.cme.msu.edu/>). As sequências foram submetidas ao banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) sob o número de acesso PRJNA76708.

Enquanto as amostras dos reatores em batelada com ibuprofeno e as amostras do reator RLF, foram enviadas para a empresa NGS soluções genômicas (Piracicaba, SP -

Brasil), para realização do sequenciamento e análise de bioinformática. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com set de primers 341F/806R Klindworth et al. (2013); Caporaso et al (2011), e purificadas com AMPure XP beads. Na inclusão dos barcodes foi usado o kit Nextera XT. As bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando a biblioteca de DNA UltraNBNext ®Kit para Illumina (New England Biolabs, Ipswich, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os dados foram analisados conforme previamente publicado (Callahan et al., 2013), usando um conjunto de pacotes implementados na linguagem R (Core Team. 2019). O processamento dos dados de sequenciamento foi realizado pelo programa DADA2 (Callahan et al. 2013), as taxonomias foram atribuídas a cada ASV (do inglês Amplicon Sequencing Variants) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificador bayesiano ingênuo para essa finalidade (Wang et al, 2007). A função que atribui a Taxonomia toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de sequências de referência com taxonomia conhecida. O banco de dados SILVA foi utilizado como referência (Glockner et al., 2017). As sequências foram submetidas ao banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) sob números de acessos PRJNA759422 (ibuprofeno) e PRJNA759422 (RLF).

As potenciais vias metabólicas envolvidas no processo de degradação do ibuprofeno foram definidas com base no estudo de Granatto et al. (2020). Além disso, realizou-se a predição dos potenciais genes codificantes de enzimas envolvidas em tais vias, por meio da ferramenta *Tax4Fun2* v. 1.1.6 (WEMHEUER et al., 2020) em linguagem R, baseadas na *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (97% identity cutoff) e na base de dados *The Comprehensive Enzyme Information System* (BRENDA) (<https://www.brenda-enzymes.org/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reatores em batelada

5.1.1 Avaliação da influência do etanol na remoção de nitrato em reatores controles

Ensaio preliminares foram realizados em reatores em batelada inoculados com a biomassa proveniente do sistema de lodos ativados ($1,0 \text{ gSSV L}^{-1}$) e em meio sintético *Döfling*. Dessa maneira, analisou-se quatro condições controles sem os fármacos, na presença de nitrato ($100 \pm 6,5 \text{ mg L}^{-1}$), com ($100 \pm 10,5 \text{ mg L}^{-1}$) e sem etanol, e com e sem atmosfera com argônio (Figuras 5.1 e 5.2).

Figura 5.1. Variação temporal de remoção de nitrato dos reatores em batelada em condições controles

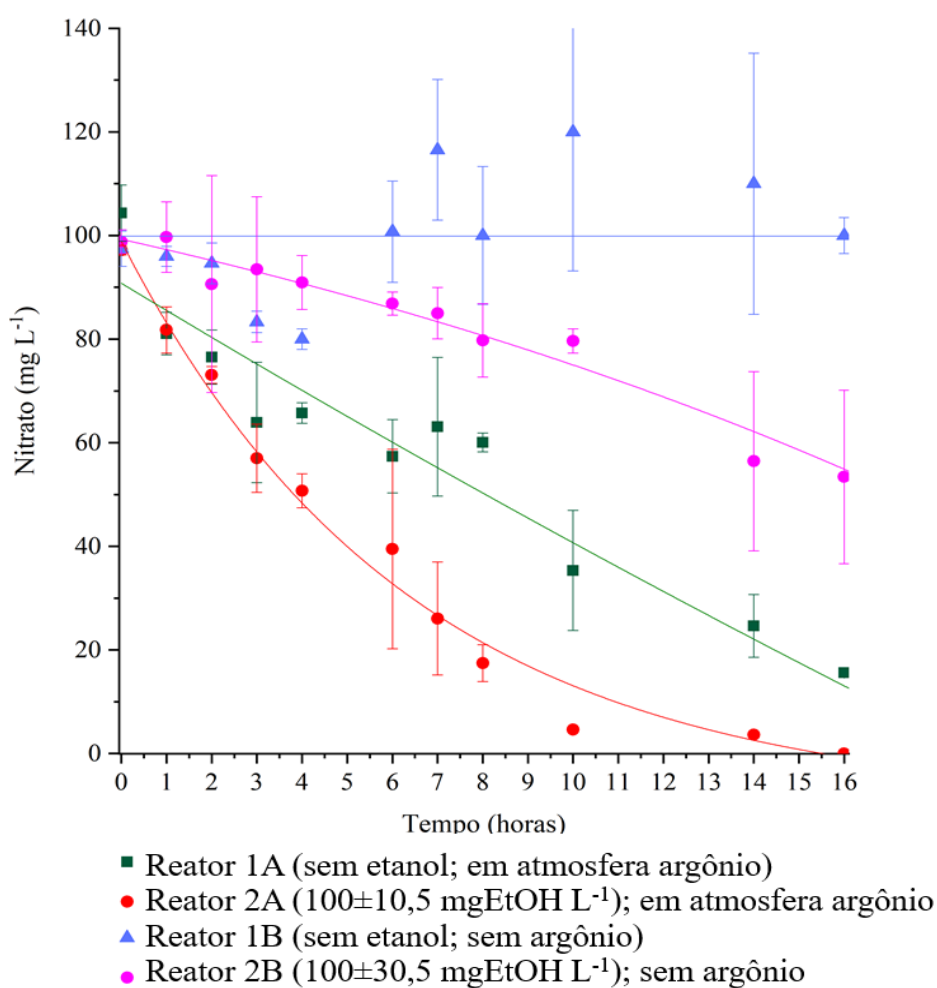
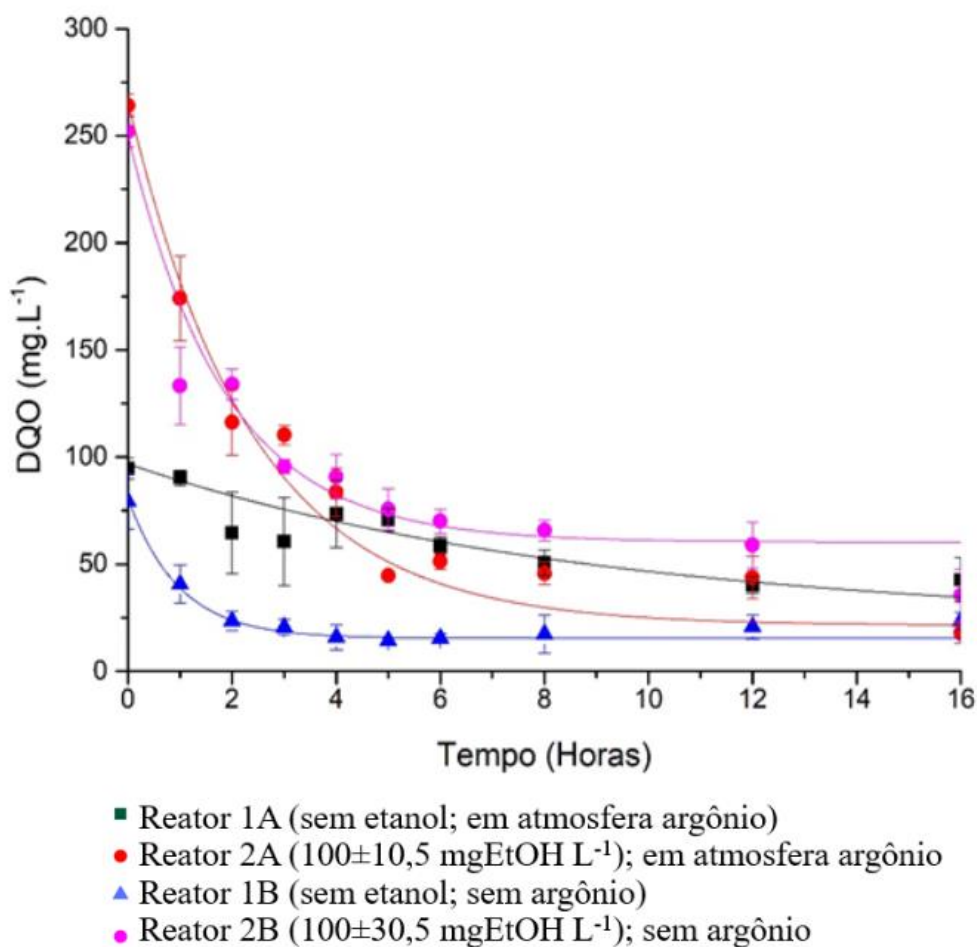


Figura 5.2. Variação temporal de remoção de matéria orgânica dos reatores em batelada em condições controles



No reator sem atmosfera de argônio e sem etanol (1B) não foi observada remoção de nitrato ($100 \pm 6,5 \text{ mg L}^{-1}$ inicial). Neste ensaio, verificou-se a remoção de $30 \pm 15\%$ de matéria orgânica para inicial de $79,33 \pm 2,85 \text{ mgDQO L}^{-1}$. Sob tais condições, é possível inferir que não houve a desnitrificação via remoção do nitrato.

Nas condições do reator sem atmosfera de argônio e com etanol (2B) observou-se remoção de 46% de nitrato. Sob tais condições, observou-se remoção de $76,62 \pm 15\%$ de matéria orgânica para $252 \pm 7,21 \text{ mg DQO L}^{-1}$ inicial. Sendo assim, nota-se que sob as condições avaliadas, a adição de co-substrato orgânico foi favorável à desnitrificação via remoção do nitrato.

Nos ensaios com atmosfera de argônio e sem etanol (1A) verificou-se 80% de remoção de nitrato para $104,32 \pm 0,921 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$ inicial e remoção de $44,92 \pm 7,90\%$ de matéria orgânica para $94,67 \pm 2,34 \text{ mgDQO L}^{-1}$ inicial.

A máxima remoção do nitrato (100%) ocorreu em ensaios com $100 \pm 10,5$ mg L⁻¹ de etanol e em atmosfera de argônio (2A). Sob tais condições, observou-se remoção de 84% de matéria orgânica para $264 \pm 14,32$ mgDQO L⁻¹ inicial. Provavelmente, a completa remoção do nitrato foi devido ao etanol que atuou como doador de elétrons para a redução desassimilativa do nitrato quando comparada com as demais condições nutricionais. Ademais, a condição em atmosfera argônio pode ter contribuído para menor concentração do oxigênio dissolvido no meio, e com isso, maior favorecimento de condição anóxica, sobrepondo o metabolismo desnitrificante. Tal observação justifica maior remoção de nitrato nesta condição (100%) em relação ao ensaio 2B, no qual foi observado 80% de remoção de nitrato, com etanol ($100 \pm 30,5$ mgEtOH L⁻¹), mas sem atmosfera argônio. Provavelmente, sob tais condições, o oxigênio presente nos reatores contribuiu para o total consumo do etanol por bactérias aeróbias em detrimento das desnitrificantes sob condições anóxicas.

Assim, para os ensaios preliminares, observou-se que a melhor condição foi aquela com nitrato ($100 \pm 10,5$ mg L⁻¹), matéria orgânica ($264 \pm 14,3$ mgDQO L⁻¹) e atmosfera argônio.

5.2 Ensaio com diclofenaco

5.2.1 Ensaio em condições controles

Os reatores controles (R_I, R_{II}, R_{III} e R_{IV}) foram conduzidos para avaliar a remoção do nitrato e matéria orgânica em condição desnitrificante, dessa forma, todas as condições apresentaram nitrato no meio nutricional, a fim de avaliar o potencial desnitrificante via remoção do nitrato.

Os maiores valores de remoção de matéria orgânica foram observados nos reatores com etanol, a saber: R_{II} ($55,1 \pm 1,5\%$) e R_{IV} ($67,4 \pm 1,1\%$) com concentração inicial de $361 \pm 3,6$ mgDQO L⁻¹ e $370 \pm 5,0$ mgDQO L⁻¹, respectivamente. Em relação aos ensaios sem adição de co-substrato orgânico, as eficiências de remoção de matéria orgânica foram de $44,6 \pm 4,9\%$ e $51,3 \pm 1,5\%$ em R_I e R_{III} para $13,4 \pm 1,7$ mgDQO L⁻¹ e $19,3 \pm 0,2$ mgDQO L⁻¹ inicial, respectivamente. Vale salientar que a eficiência de remoção de matéria orgânica dos reatores controles não foi significativa ($p < 0,05$); entretanto, na condição com etanol ($150,0 \pm 12,5$ mgEtOH L⁻¹) foi observada maior remoção da matéria orgânica em

comparação aos demais reatores (sem etanol). Dessa forma, nas condições com etanol como doador de elétrons biodegradável foi observada maior remoção da matéria orgânica e diclofenaco, a partir de medições iniciais e finais da operação nas amostras líquidas.

A partir de tais resultados, é possível inferir nos ensaios com nitrato, a concentração inicial do etanol foi importante na remoção da matéria orgânica. Resultados similares foram observados por Torresi et al. (2017), os quais evidenciaram o cometabolismo na remoção da matéria orgânica em reatores em bateladas com $70 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $40 \text{ mg EtOH L}^{-1}$ e $2 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$. De acordo com os autores supracitados, sob tais condições observaram 60% de remoção de matéria orgânica, enquanto em condições sem o co-substrato, a remoção foi de apenas 30%.

Os valores observados para velocidade de remoção de nitrato foram de $0,1 \text{ h}^{-1}$ para o R_I ($171,9 \pm 20,6 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$); $0,1 \text{ h}^{-1}$ para R_{II} ($149,7 \pm 14,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$, $150 \pm 5,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$); $0,1 \text{ h}^{-1}$ para R_{III} ($145,2 \pm 4,5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $85 \pm 3,5 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$) e $0,2 \text{ h}^{-1}$ para R_{IV} ($139,7 \pm 18,7 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$, $80 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$, $160 \pm 12,3 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) (Figura 5.3 e Tabela 5.1). As reações de desnitrificação heterotrófica foram de acordo com aquelas propostas por Madigan et al. (1997) e Stams (1994), sendo a Equação 5.1 equivalente à conversão do nitrato em nitrogênio molecular.

Tabela 5.1 Coeficientes cinéticos e remoção da matéria orgânica nos reatores em bateladas em condições controles.

Reator	DQO inicial	Remoção (%)	Coeficientes cinéticos		
			k (h ⁻¹)	R ²	Cr*
R _I (NO ₃)	13,4 ± 1,7	44,6 ± 4,9	0,1	97	89,3
R _{II} (NO ₃ /EtOH)	361,0 ± 3,6	55,1 ± 0,6	0,1	99	0
R _{III} (NO ₃ /DCF)	19,3 ± 0,2	51,3 ± 1,6	0,1	92	80,0
R _{IV} (NO ₃ /DCF/EtOH)	370,0 ± 5,0	67,4 ± 1,1	0,2	95	0

Os erros apresentados após as médias (±) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata. *Cr: Concentração residual de nitrato (mgL⁻¹)

A Equação 5.1 é proposta para a desnitrificação com etanol, resultando na formação do nitrogênio molecular e a mineralização do composto orgânico. Dessa forma, a Equação 5.2 representa a conversão do nitrogênio em condições autotróficas, como pode ter ocorrido no reator R_I; enquanto a Equação 5.3 representa a desnitrificação com a assimilação do etanol, como doador de elétrons, e o nitrato como acceptor de elétrons, predominante nos reatores R_{II} e R_{IV}. Vale salientar que apenas nos ensaios R_{II} e R_{IV} foi possível observar a completa remoção do nitrato, sendo possível inferir que a desnitrificação ocorreu apenas na presença do etanol como doador de elétrons.

Dessa forma, nos reatores controles R_{II} e R_{IV}, observou-se que o etanol favoreceu a desnitrificação via remoção do nitrato. De forma similar, Horová et al. (2020) relacionaram o potencial desnitrificante do inóculo proveniente da biomassa de lodos ativados com a adição de diferentes fontes de carbono orgânico (etanol, metanol e acetato) a partir de 1,5 g NO₃⁻ L⁻¹, sendo seus efeitos avaliados em reatores em batelada. Os autores supracitados obtiveram desnitrificação total com etanol (447 mgDQO L⁻¹) e maior velocidade de remoção do nitrato em comparação com as demais fontes exógenas de carbono.

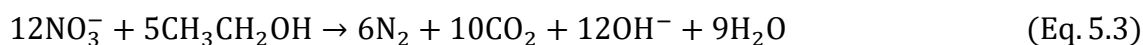
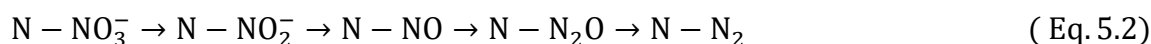
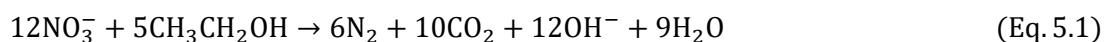
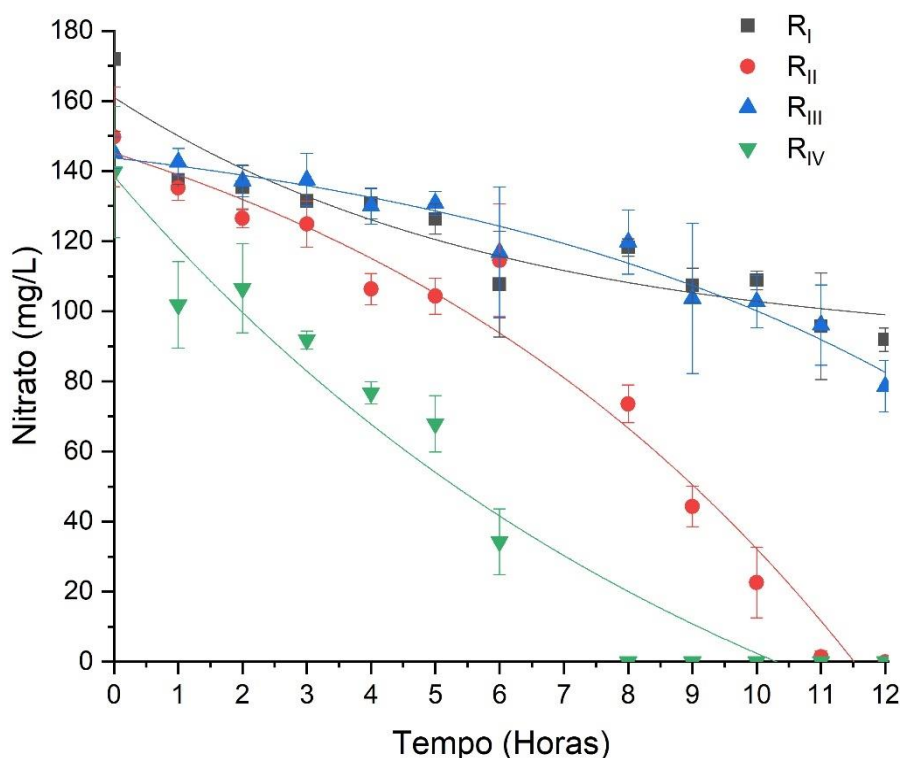


Figura 5.3. Variação temporal de remoção de nitrato dos reatores em batelada das condições controles.



Reator I= $171,9 \pm 20,6 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; Reator II= $149,7 \pm 14,1 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $150 \pm 5,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$; Reator III= $145,2 \pm 4,5 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $85 \pm 3,5 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; Reator IV= $139,7 \pm 18,7 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $80 \pm 0,7 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $160 \pm 12,3 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.

Além disso, Ciudad et al (2005) observaram que ocorrência da desnitrificação heterotrófica depende diretamente da disponibilidade de matéria orgânica, tornando necessária a adição de uma fonte externa de carbono em caso de insuficiência de substrato orgânico no meio reacional. De acordo com os autores supracitados a adição da matéria orgânica facilmente biodegradável resulta em maior velocidade de desnitrificação, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Em contrapartida, não houve total remoção de nitrato, desnitrificação completa, na presença do diclofenaco no R_{III} ($145,2 \pm 4,5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1} + 85 \pm 3,5 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$). Provavelmente, a concentração do fármaco foi insuficiente para a desnitrificação como corroborado por Ozdemir et al. (2015), os quais obtiveram acúmulo de nitrato durante 10h de operação de reatores em bateladas com $100 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$ e $100 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$. Tais condições foram semelhantes ao presente estudo com $145,2 \pm 4,5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $85 \pm 3,5 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$. Segundo os autores supracitados, baixa concentração de diclofenaco foi desfavorável a desnitrificação total.

Em relação aos parâmetros cinéticos, para o reator R_{III} ($145,2 \pm 4,5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1} + 85 \pm 3,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de DCF), com $19,1 \pm 0,2 \text{ mg DQO L}^{-1}$ inicial, verificou-se que a velocidade de desnitrificação ($0,1 \text{ h}^{-1}$) foi semelhante ao obtido para o reator R_I, contendo apenas nitrato ($171,9 \pm 20,6 \text{ mg L}^{-1}$) e $7,7 \pm 0,36 \text{ mg DQO L}^{-1}$ inicial, e também para o reator R_{II} ($149,7 \pm 14,1 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $150 \pm 5,6 \text{ mg EtOH L}^{-1}$) com $361,0 \pm 3,6 \text{ mg DQO L}^{-1}$ inicial. No entanto, para a condição R_{IV} verificou-se maior valor da velocidade de desnitrificação ($0,2 \text{ h}^{-1}$), provavelmente favorecida pelo etanol, promovendo a remoção completa do nitrato em menor tempo de operação e em maior velocidade.

No reator R_{III} ($85 \pm 3,5 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$ e $145,2 \pm 4,5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$) observou-se $9,6 \pm 0,9\%$ de eficiência de remoção de DCF. Neste reator, a principal fonte de matéria orgânica foi referente ao inóculo, sendo a remoção de matéria orgânica de $51,3 \pm 1,6\%$ para a concentração inicial de $19,1 \pm 0,2 \text{ mg DQO L}^{-1}$. Sob tais condições, a remoção do nitrato foi de $45,9 \pm 5,3\%$ para concentração inicial de $145,2 \pm 4,5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$.

No reator R_{IV} ($80,0 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{g DCF L}^{-1}$, $139,7 \pm 18,7 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $160 \pm 12,3 \text{ mg EtOH L}^{-1}$) observou-se $12,3 \pm 5,0\%$ de remoção de DCF, além de $67,4 \pm 1,1\%$ de remoção de matéria orgânica a partir de $370 \pm 5,0 \text{ mg DQO L}^{-1}$ inicial. Nesta condição, a eficiência de remoção do fármaco foi semelhante ao reator sem etanol; entretanto, a remoção de nitrato foi de 100% ($139,7 \pm 18,7 \text{ mg L}^{-1}$ inicial) durante 8 horas de experimento. Dessa forma, observa-se que o etanol não favoreceu para maior remoção do diclofenaco, mas contribuiu

para a total remoção do nitrato. Nas condições sem adição de matéria orgânica (R_I), a remoção do nitrato foi de $38,8 \pm 3,2\%$ para $171,9 \pm 20,6$ mg NO₃ L⁻¹ inicial (Tabela 5.2). Em todos os reatores em bateladas das condições controles, não foi observado ácidos orgânicos voláteis, sendo este um resultado comum em condições desnitrificantes (SHEN e al., 2013).

Em relação ao diclofenaco adsorvido na biomassa de lodos ativados, foi observado $0,08 \mu\text{g DCF L}^{-1}$. Por meio do balanço de massa dos reatores R_{II} e R_{IV} observou-se adsorção de 1,4% e 1,9%, respectivamente. Dessa forma, notou-se que a adsorção não foi a principal via de remoção do diclofenaco. Granatto et al. (2021) observaram 1,7% de adsorção do propranolol (PRO) na biomassa de reatores em bateladas com etanol sob condição metanogênica. O PRO e DCF possuem em suas estruturas químicas anel aromático e coeficiente de partição octanol-água superior a 3,0 (log K_{ow} DCF = 3,9; log K_{ow} PRO = 3,5).

Tabela 5.2. Valores de remoção de nitrato, diclofenaco e etanol nos reatores em batelada sob condições controles.

Reatores	R _I	R _{II}	R _{III}	R _{IV}
Nitrato (NO ₃ ⁻)				
Inicial (mg L ⁻¹)	$171,9 \pm 20,6$	$149,7 \pm 14,1$	$145,2 \pm 4,5$	$139,7 \pm 18,7$
Final (mg L ⁻¹)	$91,9 \pm 3,3$	0	$78,5 \pm 7,3$	0
Remoção (%)	$46,5 \pm 2,6$	100	$45,9 \pm 5,3$	100
Diclofenaco (DCF)				
Inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	-	$85 \pm 3,5$	$80 \pm 0,7$
Final ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	-	$77 \pm 2,0$	$70 \pm 2,3$
Remoção (%)	-	-	$9,65 \pm 0,9$	$12,3 \pm 5,0$
Adsorção (%)	-	-	1,0	1,5
Etanol (EtOH)				
Inicial (mg L ⁻¹)	-	$150 \pm 5,6$	-	$160 \pm 12,3$
Final (mg L ⁻¹)	-	$73,6 \pm 5,6$	-	$75,3 \pm 12,5$
Remoção (%)	-	$50,2 \pm 7,8$	-	$65,6 \pm 2,3$

Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.

5.2.2 Delineamento do composto central rotacional

Em todas as condições experimentais via DCCR observou-se remoção média de até 23,6% de diclofenaco e total de nitrato (Tabela 5.3) e verificadas nas faixas dos pontos centrais com concentrações iniciais de $180,5 \pm 8,2 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$, $78,0 \pm 2,6 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $183,5 \pm 28,7 \text{ mgEtOH L}^{-1}$.

Tabela 5.3 Matriz DCCR para concentrações de nitrato (x1), diclofenaco (x2), etanol (x3) e eficiência de remoção do diclofenaco.

Reator	Variáveis independentes (x)			Variável resposta (Y)	
	Nitrato (x ₁)	Diclofenaco (x ₂)	Etanol (x ₃)	Remoção Diclofenaco	Adsorção diclofenaco
	mg L ⁻¹	µg L ⁻¹	mg L ⁻¹	(%)	(%)
1	124,3±1,6	73±8,1	133,3±16,7	0 ± 0,8	0
2	227,8±5,5	78±3,6	132,8±9,1	1,3 ± 0,7	1,8
3	128,4±5,1	101±13,6	138,5±8,1	6,6 ± 4,7	1,1
4	200,5±5,9	104±5,6	158,2±4,5	0 ± 0	0
5	131,2±7,1	75±2,5	243±10,2	5,0 ± 3,9	1,7
6	226,3±7,3	76±2,7	223,5±12,4	8,3 ± 0,6	1,6
7	135,2±2,1	100±4,7	230±6,0	25,2 ± 2,4	1,3
8	225,8±7,9	112±2,8	247,5±7,8	1,7 ± 0,5	1,2
9	95,9± 2,1	101,5±0,7	162,4±12,5	5,9 ± 0	1,7
10	250±10,2	96±1,1	160,0±6,9	0 ± 0	0
11	176,6±3,7	57±2,0	158,8±5,3	7,0 ± 3,5	1,4
12	184,2±2,4	146,3±22,3	203,0±7,8	11,3 ± 1,5	0,8
13	197,7±5,4	95±8,6	100,5 ±25,3	1,7 ± 0,5	1,8
14	179,0±2,5	96±5,2	278,9±13,2	7,6 ± 0,8	1,4
15	180,5±8,2	78±2,3	183,5±4,8	22,4 ± 2,5	1,0
16	186,7±4,9	80,7±4,1	178,8±9,2	21,2 ± 4,0	1,5
17	180,5±8,2	73,3±3,6	183,5±28,7	23,6 ± 9,3	1,1
otimizado	176,6 ±5,2	76,8±3,7	180±2,5	17,5 ± 2,0	1,0

Embora, maiores concentrações de nitrato (> $250 \pm 10,2 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$) e etanol (> $278,9 \pm 13,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) não tenham favorecido a remoção do fármaco, foi observado que tais variáveis ocasionaram impactos significativos em relação à remoção do fármaco

($p < 0,05$) conforme Tabela 5.4. Na condição experimental com menor concentração de nitrato ($95,1 \pm 2,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$) com $162,4 \pm 12,5 \text{ mgEtOH L}^{-1}$ e $101,5 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$ foram obtidos 5,9% de remoção de diclofenaco e 100% de remoção de nitrato. Sob tais condições, foi possível inferir que a menor concentração do nitrato foi adversa à remoção do fármaco. Todavia, Kassotaki et al. (2018) obtiveram máxima remoção de sulfametoxazol SMX (60%) em condição anóxica em reatores em bateladas a partir de $1,0 \text{ g NO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $1,3 \text{ g DQO L}^{-1}$. Vale salientar que o SMX se assemelha estruturalmente ao DCF pela presença do grupamento amina e de dois anéis aromáticos.

A remoção do nitrato foi completa em todas as condições avaliadas, mesmo nos ensaios contendo concentrações máximas do diclofenaco ($146,3 \pm 22,3 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$). Dessa forma, as maiores concentrações do fármaco não ocasionaram impactos na remoção do nitrato. No entanto, o consumo do nitrato foi favorecido pelo etanol nas bateladas, como corroborado nos ensaios controles, nos quais apenas com o diclofenaco, o nitrato foi parcialmente removido, tornando necessária a adição do co-substrato orgânico para a completa desnitrificação. Assim, é possível inferir que para as condições analisadas, o etanol foram doadores de elétrons na desnitrificação, e que o etanol contribuiu para a máxima remoção do nitrato.

Tais observações obtidas neste estudo foram semelhantes aquelas observadas por Torresi et al (2017) quanto à total remoção de nitrato em condições desnitrificantes avaliadas para remoção de fármacos. Os autores obtiveram remoção completa de nitrato ($70 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$) em 24 h de operação, mesmo em concentração máxima ($2,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) dos fármacos sulfametoxazol, carbamazepina e sulfametizol. Os autores operaram reatores em batelada em condições desnitrificantes com $70 \pm 3 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $239 \pm 2 \text{ mgDQO L}^{-1}$ de metanol como co-substrato. Dessa forma, os fármacos não inibiram a desnitrificação via remoção do nitrato.

As concentrações do etanol nas fases iniciais e finais do experimento, assim como a eficiência de remoção obtida em cada ensaio encontram-se resumidas na Figura 5.4. Em menor concentração de etanol ($100,5 \pm 25,3 \text{ mg L}^{-1}$), a remoção do diclofenaco ($95,0 \pm 8,6 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrato ($197,7 \pm 5,4 \text{ mg L}^{-1}$) foi de $1,7 \pm 0,5\%$ e 100%, respectivamente. Além disso, pela Tabela 5.4, observou-se que a variável independente etanol apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) na remoção do diclofenaco, sendo possível inferir que o etanol favoreceu a remoção do fármaco. Provavelmente, ocorreu o uso do composto orgânico biodegradável por meio do cometabolismo para a biomassa desnitrificante.

Maior eficiência da remoção de etanol (77,85%) foi observada na condição contendo $135,2 \pm 2,1$ mg L⁻¹ de nitrato, $100 \pm 4,7$ µg L⁻¹ de diclofenaco e $230 \pm 6,0$ mg L⁻¹ de EtOH. No reator com $230 \pm 6,0$ mg EtOH L⁻¹, houve a remoção de $25,2 \pm 2,4\%$ de diclofenaco ($100 \pm 4,7$ µg L⁻¹) e 100% de nitrato ($135,2 \pm 2,1$ mg L⁻¹) com eficiência de remoção do etanol de $77,85 \pm 8,5\%$. Vale salientar que não foi observado acúmulo de ácidos orgânicos em todas as condições do DCCR. Por fim, foi possível concluir com base nos ensaios via DCCR que o co-substrato (EtOH) favoreceu a remoção do diclofenaco.

Maiores eficiências de remoção do diclofenaco foi de $23,6 \pm 8,6\%$ para concentração inicial de $180,5 \pm 8,2$ mg L⁻¹ de nitrato, $73,3 \pm 3,6$ µg L⁻¹ de diclofenaco e $183,5 \pm 28,7$ mg L⁻¹ de etanol. Ooi et al. (2018) avaliaram a remoção do diclofenaco em reatores em batelada contendo água residuária hospitalar. Os autores verificaram $20 \pm 3\%$ de remoção de diclofenaco para concentração inicial de 20 µg DCF L⁻¹, 20 mg NO₃ L⁻¹ e 100 mg EtOH L⁻¹. Além disso, Ozdemir et al (2015) obtiveram 2% de remoção do diclofenaco (100 µg L⁻¹) em reatores em batelada com inóculo de lodos ativados e meio sintético com 140 mg L⁻¹ de nitrato, 36 mg L⁻¹ de extrato de levedura e 720 mg L⁻¹ de glicose. De forma similar ao presente estudo, os autores observaram 100% de remoção de nitrato em 6 dias de operação. Dessa forma, a eficiência de remoção do fármaco observadas por Ooi et. 2018, Ozdemir et al. 2015 foram inferiores em comparação às observadas no presente estudo. No entanto, independentemente da concentração inicial do diclofenaco, houve a desnitrificação via remoção do nitrato, semelhante ao observado pelos autores mencionados anteriormente.

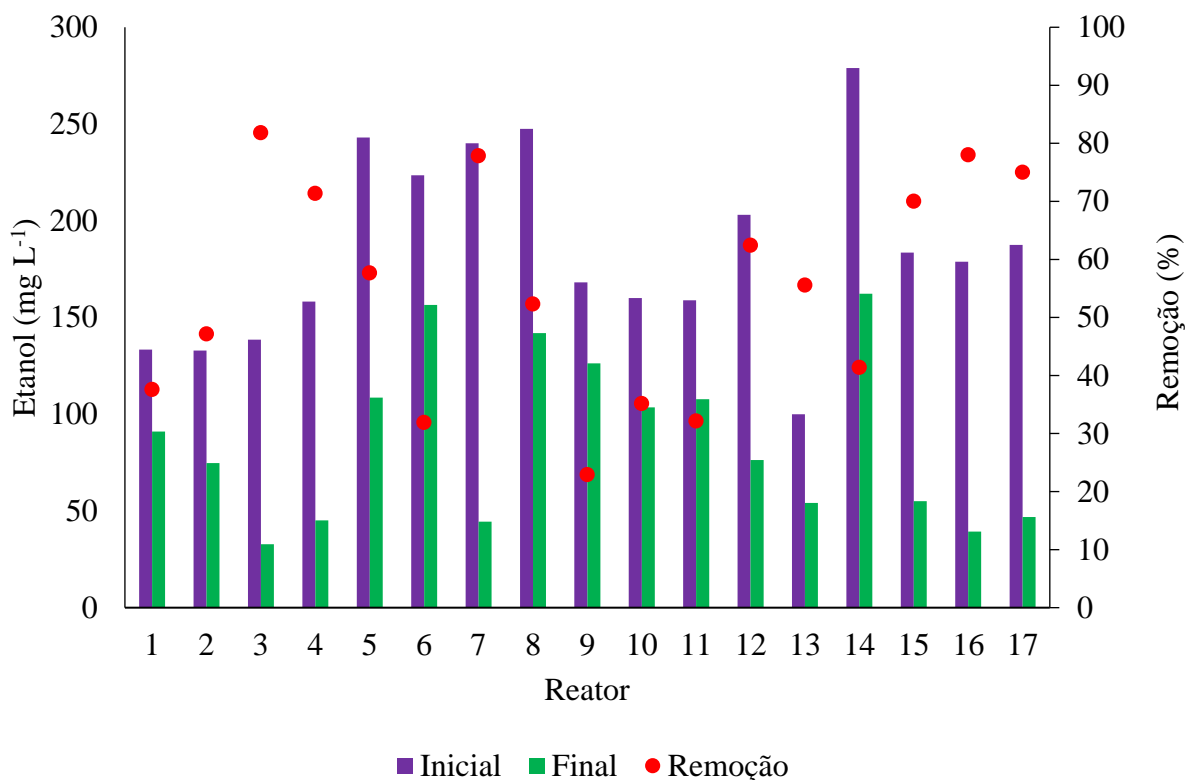
No presente estudo, apesar da remoção de nitrato ter sido completa em todas as condições avaliadas ($95,1 \pm 2,1$ a $227,8 \pm 5,5$ mgNO₃ L⁻¹), vale destacar que a maior eficiência de remoção do diclofenaco ($25,2 \pm 2,4\%$) foi observada na condição contendo $135,2 \pm 2,1$ mgNO₃ L⁻¹, $100 \pm 4,7$ µgDCF L⁻¹, $230 \pm 6,0$ mgEtOH L⁻¹.

Em menores concentrações de etanol e do fármaco, Arias et al. (2018) avaliaram a remoção do diclofenaco em condições desnitrificantes em reatores em batelada com biomassa de tanque de nitrificação como inóculo. Nos ensaios contendo 80 mg EtOH L⁻¹, 10 µg DCF L⁻¹ e 130 mg NO₃ L⁻¹, os autores obtiveram 15% de eficiência de remoção do diclofenaco e 100% de remoção de nitrato ao longo de 6 horas de operação.

Dessa forma, com a operação dos ensaios via DCCR foi possível observar que o diclofenaco foi removido em condições desnitrificantes a partir do etanol e diclofenaco como fontes de carbono. A desnitrificação via remoção do nitrato ocorreu a partir da assimilação do etanol como doador de elétrons no processo cometabólico.

Conforme análise estatística do planejamento experimental, foram verificados os efeitos da remoção do diclofenaco para as variáveis independentes (NO_3 , DCF e EtOH), com nível de confiança superior a 93,45%.

Figura 5.4. Remoção de etanol nos ensaios do DCCR.



Após aplicação da regressão linear múltipla aos dados experimentais do delineamento, obteve-se a equação ajustada completa (Equação 5.4) referente a remoção de diclofenaco (Y_{resposta}), sendo Y o valor da variável dependente (remoção de diclofenaco, %), x_1 a concentração inicial de NO_3 (mg L^{-1}), x_2 a concentração inicial de diclofenaco ($\mu\text{g L}^{-1}$) e x_3 é a concentração inicial de etanol (mg L^{-1}).

Os coeficientes de regressão das interações dos fatores (NO_3 , DCF e EtOH) (Tabela 5.4) foram obtidos através da matriz codificada.

$$Y = 22,30 - 2,59X_1 + 2,09X_3 - 6,55X_1^2 - 4,36X_2^2 - 5,95X_3^2 - 4,34X_1X_2 \quad (\text{Eq. 5.4})$$

Tabela 5.4. Coeficientes de regressão do planejamento experimental.

Fatores	Coeficientes de regressão	Coef - IC	Coef +IC	IC	p-valor	Conclusão*
Média	22,31	17,46	27,13	4,83	0,0000	s
x₁ (L)	-2,59	-4,86	-0,32	2,27	0,0266	s
x₁ (Q)	-6,55	-9,06	-4,05	2,50	0,0004	s
x₂ (L)	1,91	-0,35	4,18	2,27	0,0780	ns
x₂ (Q)	-4,36	-6,86	-1,85	2,50	0,0037	s
X₃ (L)	3,09	0,82	5,36	2,27	0,0125	s
x₃ (Q)	-5,95	-8,46	-3,45	2,50	0,0006	s
x₁x₂	-4,34	-7,30	-1,36	2,96	0,0090	s
x₁x₃	-1,89	-4,83	1,10	2,96	0,1681	ns
x₂x₃	1,04	-1,93	4,00	2,96	0,4202	ns

Nota: IC= Intervalo de Confiança. Erro puro = 2,88. *Efeito significativo a 95% de confiança. $R^2= 0,98$, $p<0,05$. L= termos lineares; Q= termos quadráticos; x_1 = concentração inicial de NO_3 (mg L^{-1}); x_2 = concentração inicial de DCF ($\mu\text{g L}^{-1}$); x_3 = concentração inicial de EtOH; s= significativo; ns= não significativo.

A partir da Tabela 5.5, observa-se que o valor de p do coeficiente de regressão (98%) foi significativo ao nível de 0,05%, com bom ajuste entre os valores experimentais e preditos. Além disso, o coeficiente $F_{\text{calculado}}$ (10,72) foi superior ao F_{tabelado} (2,72). Sendo assim, foi possível concluir que o modelo obtido (Equação 5.4) é adequado para avaliação da remoção de diclofenaco frente a variação da concentração inicial de nitrato, diclofenaco e etanol.

Tabela 5.5. ANOVA da remoção do diclofenaco obtido após os ensaios do DCCR.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calc}	$F_{\text{tab}} (95\%)$
Regressão	1086,1	6	181,02	10,722	2,98
Resíduos	168,83	10	16,88		
Falta de Ajuste	165,95	8	20,74	14,406	19,35
Erro Puro	2,88	2	1,44		
Total	1254,9	16			

Observou-se que os termos lineares e quadráticos das variáveis nitrato (x_1), diclofenaco (x_2) e etanol (x_3), bem como a interação da variável nitrato com os demais fatores (diclofenaco e etanol) foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

A partir de então, observou-se que a variável resposta foi mais sensível à variação do nitrato do que do etanol. A partir da equação de regressão (Equação 5.3) nota-se também que a menor concentração do nitrato (x_1), em relação à maior concentração linear de diclofenaco e etanol, contribuiu para maior remoção de diclofenaco (Y_{resposta}).

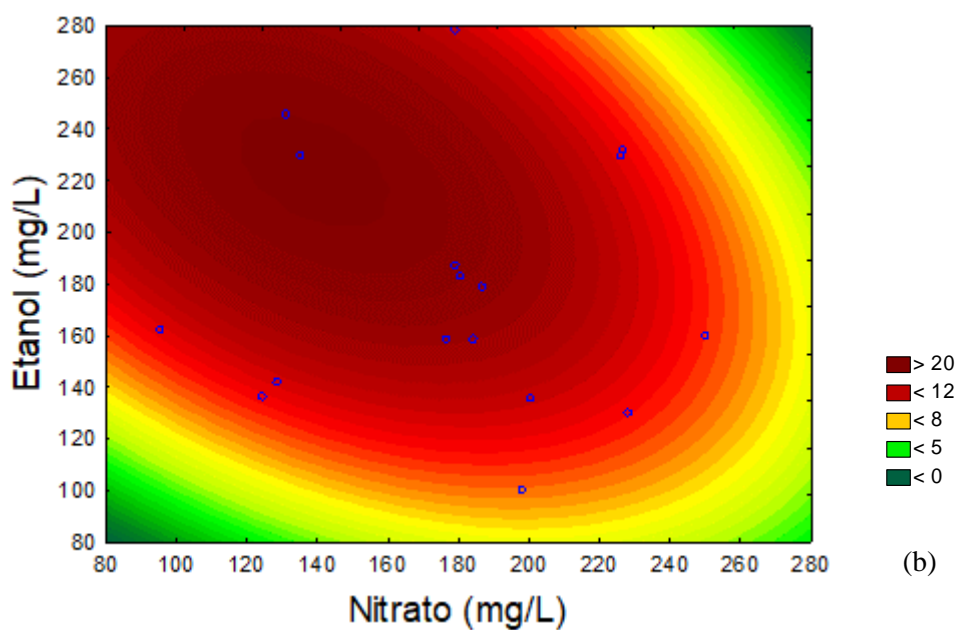
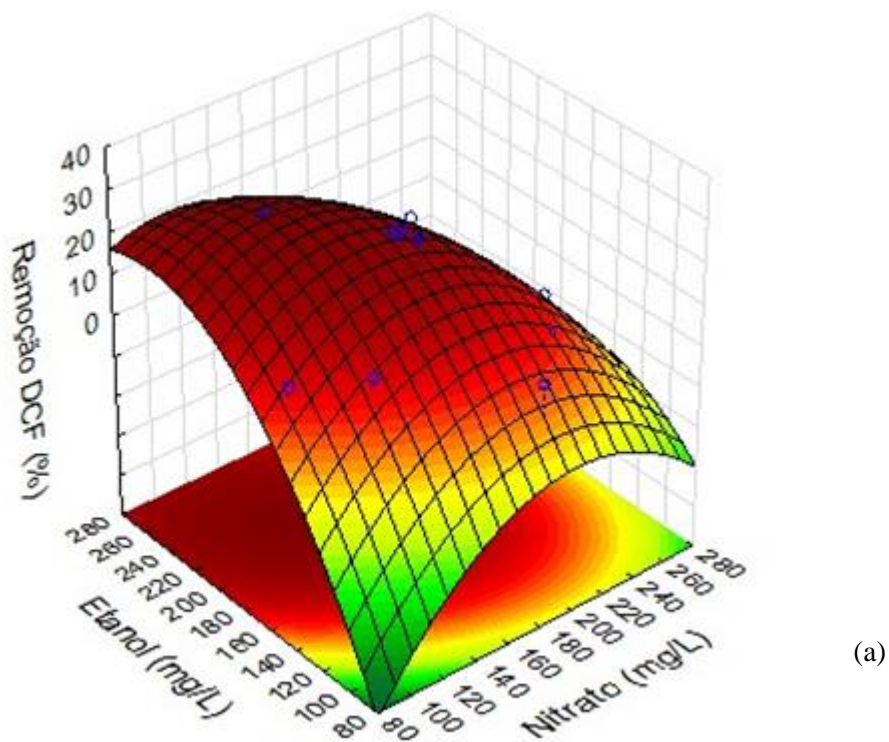
A superfície resposta (Figura 5.5) foi elaborada com base no modelo quadrático obtido via Equação 5.3. A partir desta análise, foi possível obter os valores máximos de remoção do DCF nas variações da concentração inicial de $95,9 \pm 2,1$ a $250,0 \pm 10,2$ mg NO_3 L^{-1} , $57,0 \pm 2,0$ a $146,3 \pm 22,3$ $\mu\text{g DCF L}^{-1}$ e de $100,5 \pm 25,3$ a $278,9 \pm 13,2$ mg EtOH L^{-1} . As faixas ótimas observadas foram $180,5 \pm 8,2$ mg NO_3 L^{-1} e $183,5 \pm 28,7$ mg EtOH L^{-1} , resultando em 23,6% de remoção de diclofenaco ($73,3 \pm 3,6$ $\mu\text{g L}^{-1}$).

Nota-se que para a concentração do etanol na faixa entre $100,5 \pm 25,3$ - $158,2 \pm 4,5$ mg EtOH L^{-1} , a eficiência de remoção do diclofenaco (Y_{resposta}) é mais sensível a variações na concentração inicial do nitrato.

No entanto, quando a concentração do etanol é maior ($203,0 \pm 7,8$ - $278,9 \pm 13,2$ mg L^{-1}), a remoção do diclofenaco é maior (12% – 20%) e menos susceptível a variações na concentração inicial do nitrato. Assim, para as condições apresentadas, o etanol pode ter favorecido a remoção do diclofenaco sob condições desnitrificantes.

Além disso, na menor concentração deste composto ($100,5 \pm 25,3$ mg EtOH L^{-1}) em $95 \pm 8,6$ $\mu\text{g DCF L}^{-1}$ e $197,7 \pm 5,4$ mg $\text{NO}_3 \text{L}^{-1}$, a remoção do diclofenaco ($1,7 \pm 0,5\%$) foi inferior aos demais ensaios.

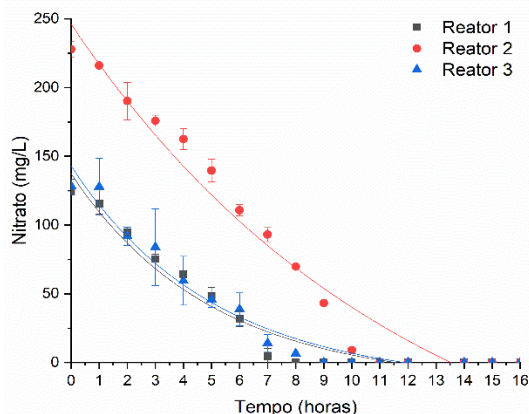
Figura 5.5. Superfície resposta e de contorno da remoção de diclofenaco (a e b) em função das concentrações de nitrato, diclofenaco e etanol.



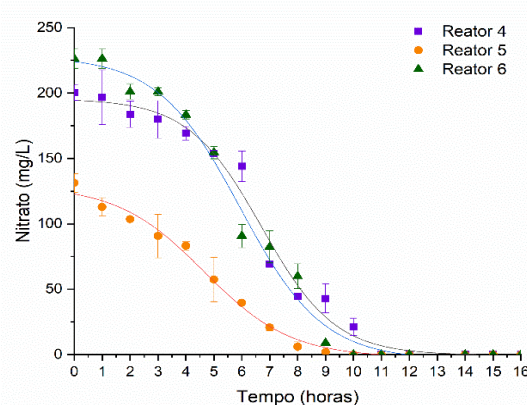
5.2.3 Remoção do nitrato nas condições do DCCR

A velocidade de desnitrificação (k) foi relacionada com as concentrações iniciais de nitrato e diclofenaco, sendo observado aleatoriedade desse parâmetro cinético em todas as condições aplicadas ao DCCR (Figura 5.6).

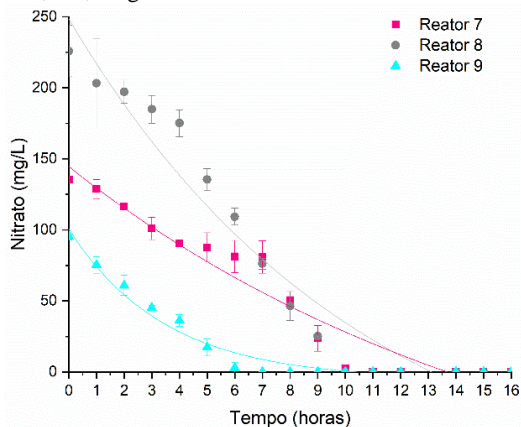
Figura 5.6. Variação temporal da remoção de nitrato nas condições dos ensaios do DCCR



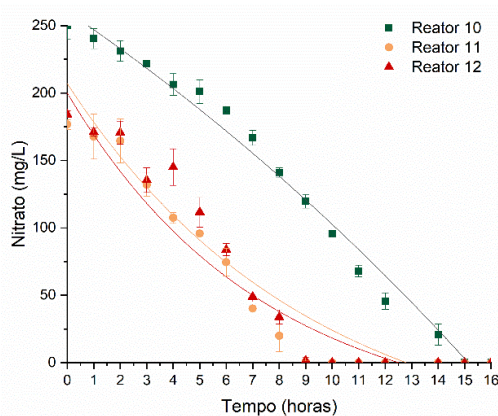
Reator 1: $124,2 \pm 1,6 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $73 \pm 8,1 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $133,3 \pm 16,7 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 2: $227,8 \pm 5,5 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $78 \pm 3,6 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $132,8 \pm 9,1 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 3: $128,4 \pm 5,1 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $101 \pm 13,6 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $138,5 \pm 8,1 \text{ mgEtOH L}^{-1}$



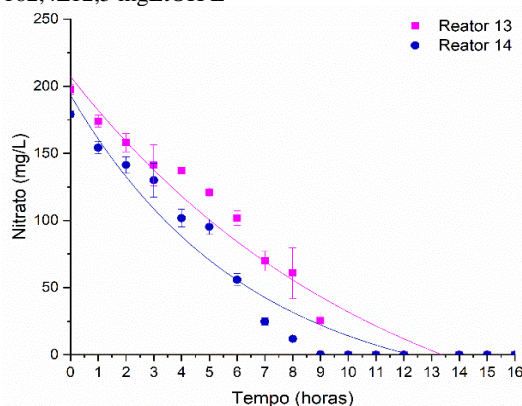
Reator 4: $200,5 \pm 5,9 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $104 \pm 5,6 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $158,2 \pm 4,5 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 5: $131,2 \pm 7,1 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $75 \pm 2,5 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $243 \pm 10,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 6: $226,3 \pm 7,3 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $76 \pm 2,7 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $223,5 \pm 12,4 \text{ mgEtOH L}^{-1}$



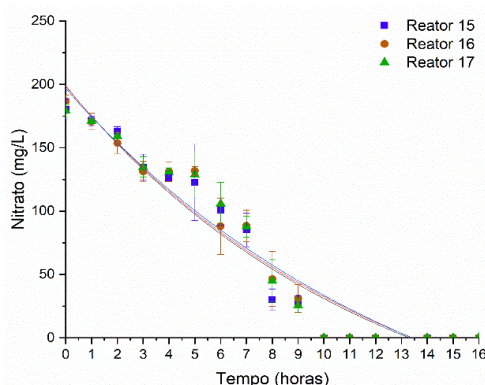
Reator 7: $135,2 \pm 2,1 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $100,0 \pm 4,7 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $230,0 \pm 6,0 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 8: $225,8 \pm 7,9 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $112 \pm 2,8 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $247,5 \pm 7,8 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 9: $95,1 \pm 2,1 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $101,5 \pm 0,7 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $162,4 \pm 12,5 \text{ mgEtOH L}^{-1}$



Reator 10: $250 \pm 10,2 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $96 \pm 1,1 \mu\text{gDCF.L}^{-1}$; $160 \pm 6,9 \text{ mgEtOH.L}^{-1}$
 Reator 11: $176,6 \pm 3,7 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $57 \pm 2,0 \mu\text{gDCF.L}^{-1}$; $158,8 \pm 5,3 \text{ mgEtOH.L}^{-1}$
 Reator 12: $184,2 \pm 2,4 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $146,3 \pm 22,3 \mu\text{gDCF.L}^{-1}$; $03 \pm 7,8 \text{ mgEtOH.L}^{-1}$



Reator 13: $197,7 \pm 5,4 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $95 \pm 8,6 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $100,5 \pm 25,3 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 14: $179 \pm 2,5 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $96,0 \pm 5,2 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $278,9 \pm 13,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$



Reator 15: $180,5 \pm 8,2 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $78 \pm 2,3 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $183,5 \pm 4,8 \text{ mgEtOH.L}^{-1}$
 Reator 16: $186,7 \pm 4,9 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $80,7 \pm 4,1 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $178,8 \pm 9,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$
 Reator 17: $180,5 \pm 8,2 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $73,3 \pm 3,6 \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $183,5 \pm 28,7 \text{ mgEtOH L}^{-1}$

A partir destas considerações, pode-se inferir que o aumento da concentração de nitrato, diclofenaco e etanol (variáveis independentes) não interferiu na cinética de remoção do nitrato.

De forma similar, Suarez et al. (2010) observaram em ensaios em batelada com inóculo de tanques de desnitrificação, que as faixas entre 10-40 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$ em meio sintético com 500 mg EtOH L^{-1} e 100 mgNO₃ L^{-1} não afetaram a velocidade de remoção do nitrato. Os resultados apresentados por tais autores corroboram com aqueles observados no presente estudo, na faixa entre $95,11 \pm 2,1$ a $227, 8 \pm 5,5$ mgNO₃ L^{-1} .

Sendo assim, observou-se que as condições ótimas de remoção de diclofenaco ($22,4 \pm 2,5\%$) ocorreram nos reatores com as seguintes condições: $183,5 \pm 28,7$ EtOH mg L^{-1} , $180,5 \pm 8,2$ mgNO₃ L^{-1} e $80,0 \pm 2,6$ $\mu\text{g DCF L}^{-1}$.

A remoção de nitrato foi de 100% mesmo para concentração máxima de diclofenaco ($146,3 \pm 22,3$ $\mu\text{g L}^{-1}$), inferindo-se que a presença do fármaco não interferiu na desnitrificação via remoção do nitrato da biomassa de sistemas de lodos ativados. Em relação aos parâmetros cinéticos, a velocidade média da remoção de nitrato foi relacionada com as concentrações iniciais de nitrato e diclofenaco conforme as Figuras 5.7 e 5.8.

Figura 5.7. Velocidade inicial da desnitrificação em função da concentração de nitrato

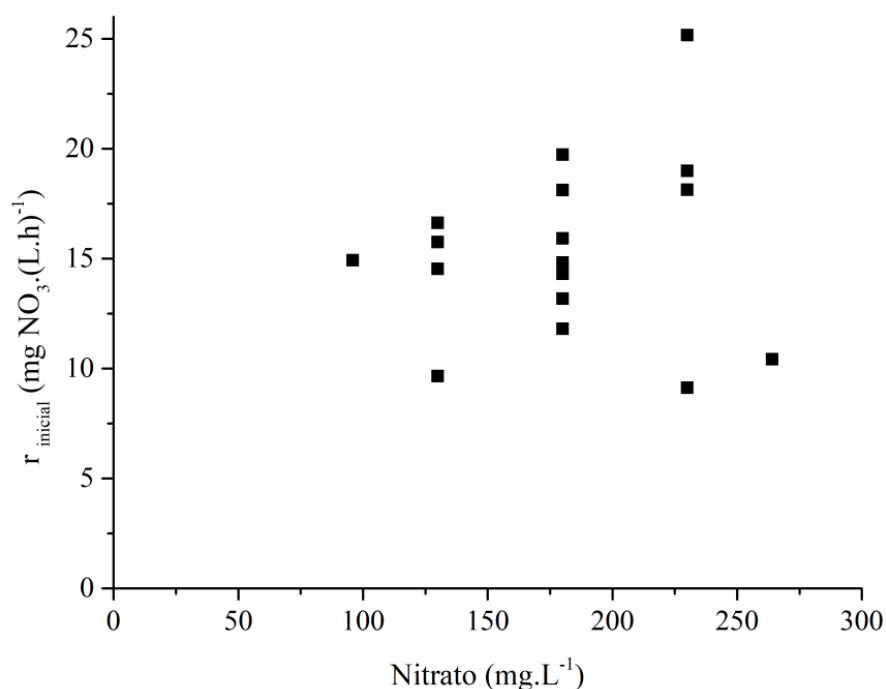
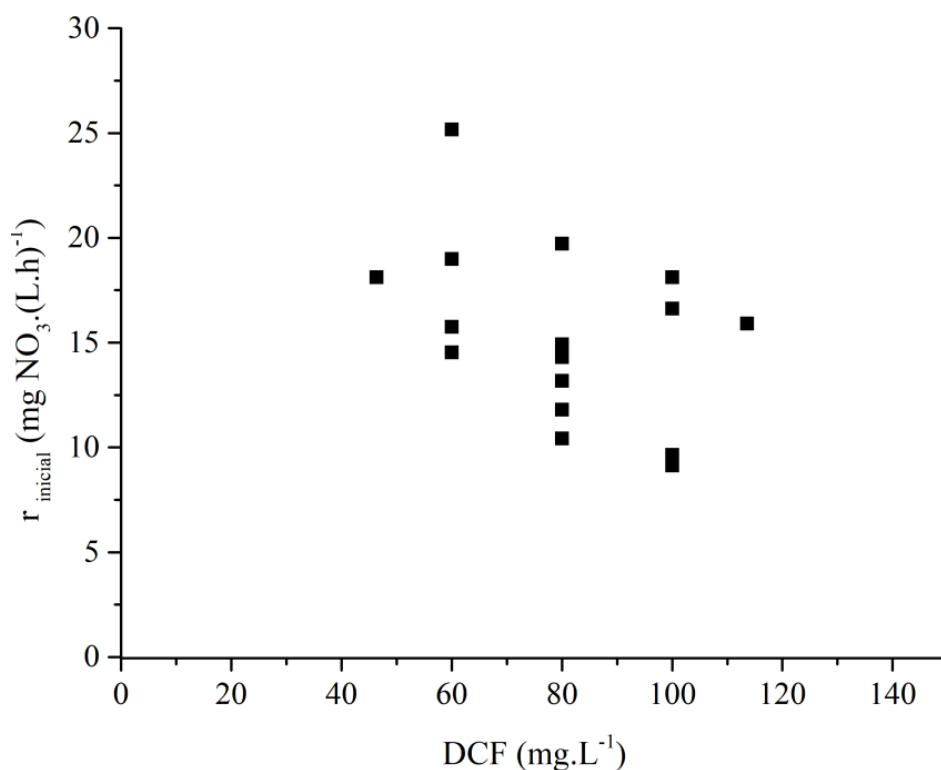


Figura 5.8. Velocidade inicial da desnitrificação em função da concentração de diclofenaco

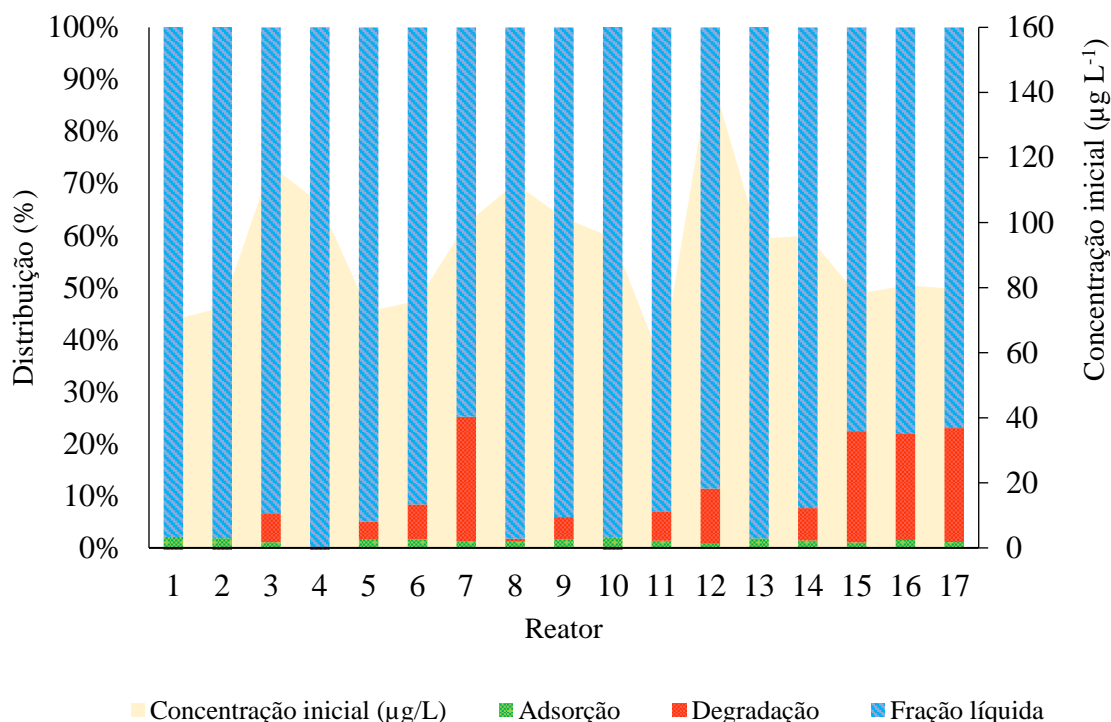


5.2.4 Balanço de massa

O diclofenaco adsorvido ao lodo foi quantificado ao final da operação dos reatores em batelada via DCCR, sendo verificado entre 0,2 a 0,6 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$. Os parâmetros de distribuição percentual do diclofenaco adsorvido, removido e recuperado na fração líquida encontram-se resumidas na Figura 5.9.

Vale salientar que a maior concentração inicial de diclofenaco não implicou no aumento da fração adsorvida (ensaio 12; 146,3 $\mu\text{gDCF L}^{-1}$), sendo que a adsorção foi de 0,3 μg a partir de 48,2 $\mu\text{g DCF}$ adicionado, no qual não foi observada diferença significativa em comparação aos demais ensaios. Resultados similares foram observados por Plósz et al., (2012) na degradação dos fármacos diclofenaco e carbamazepina, em bateladas inoculadas com biomassa proveniente de lodos ativados, cuja adsorção foi de 1,0%, próximo aos valores observados no presente estudo (1% a 2%).

Figura 5.9. Balanço de massa do diclofenaco nos reatores em batelada



Ademais, Yan et al. (2019) investigaram a capacidade de adsorção do diclofenaco em três matrizes distintas de inóculo proveniente de sistema de tratamento de esgoto sanitário, sendo: lodo concentrado ($581,1 \text{ g Kg}^{-1}$), efluentes de tanque de sedimentação ($312,4 \text{ g Kg}^{-1}$) e partículas em suspensão ($143,3 \text{ g Kg}^{-1}$). Tais autores concluíram que a maior adsorção do diclofenaco ocorreu em lodo concentrado, seguido de efluente de tanque de sedimentação e lodo diluído em partículas de suspensão no efluente. Sendo assim, uma vez que maior concentração de sólidos no lodo interfere diretamente na capacidade de sorção de compostos orgânicos, a baixa concentração de diclofenaco adsorvida e observada no presente estudo pode estar relacionada à baixa concentração de sólidos do inóculo ($1,0 \text{ gSSV L}^{-1}$).

5.2.5 Validação do modelo

A validação do modelo do planejamento experimental foi realizada a fim de verificar as faixas ótimas previstas via regressão múltipla (condição otimizada), sendo avaliada a remoção do diclofenaco em reatores em batelada com $76,8 \pm 3,7 \mu\text{g DCF L}^{-1}$,

$176,6 \pm 5,2 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $180 \pm 2,5 \text{ mg EtOH L}^{-1}$. Nestas condições, foi observada 17,5% de remoção do diclofenaco e 100% de remoção de nitrato, sendo obtida correlação entre o valor predito e o valor experimental de 18,7% e 17,5%, respectivamente.

Na condição otimizada, a remoção do nitrato foi completa em 16 horas de operação, com velocidade (k) de $0,096 \text{ h}^{-1}$, em tempo médio de 7,24 h (Figura 5.10). Com isso, foi obtida boa correlação entre o valor predito (18,7%) e o valor obtido experimentalmente (17,5%) (Tabela 5.6).

Figura 5.10. Variação temporal da remoção do nitrato em reator em batelada da condição otimizada.

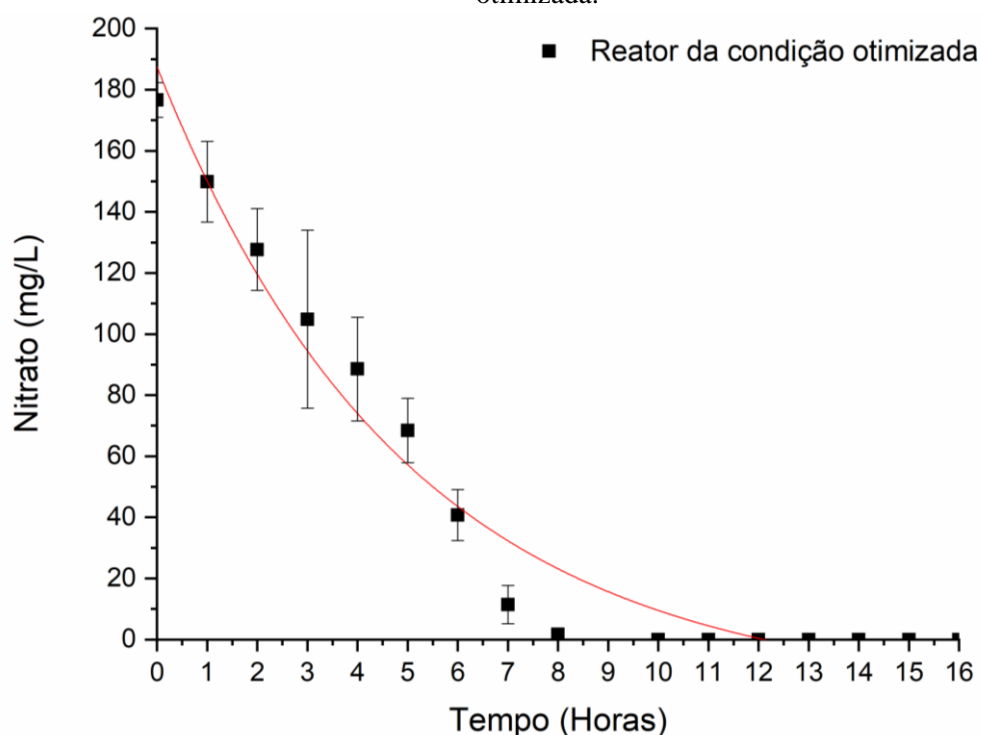


Tabela 5.6. Condições da validação experimental.

Condições	Validação experimental		
	Y (remoção de diclofenaco) (%)		
	Valor predito	Valor experimental	
Nitrato	$176,6 \pm 5,2 \text{ mg L}^{-1}$	23,00	$17,5 \pm 1,34$
Diclofenaco	$76,8 \pm 3,7 \mu\text{g L}^{-1}$		
Etanol	$180 \pm 2,5 \text{ mg L}^{-1}$		

5.2.6 Caracterização da comunidade microbiana

A caracterização microbiana foi realizada ao final da operação do reator R_{II} ($149,7 \pm 14,1 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $150 \pm 3,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) ausente de diclofenaco e reator otimizado do DCCR ($176,6 \pm 4,3 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$, $76,8 \pm 3,7 \mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $180 \pm 2,5 \text{ mgEtOH L}^{-1}$). A seleção

de tais amostras foi realizada com o intuito de verificar se houveram alterações da população microbiana com o diclofenaco. O número de sequências e OTUs, assim como os índices de diversidade para o domínio Bacteria, encontram-se resumidos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Índices de diversidade para o Dominio Bacteria.

Parâmetros	Condição controle	Condição otimizada
Número de sequências	82.404	78.808
Comprimento dos pares de bases	420	422
Total de OTU's	923	988
Coverage	0,99	0,99
Índices de diversidade		
Shannon	5,31	5,30
Chao-1	925,60	918,82

Os valores dos índices de diversidade de Shannon do reator controle (5,31) e condição otimizada (5,30) foram próximos, enquanto à riqueza relativa Chao-1 (Tabela 5.7) foi maior no reator controle em relação ao reator otimizado. Provavelmente, a maior concentração de matéria orgânica influenciou na riqueza da comunidade microbiana.

Em ambas as condições analisadas, foram identificados 26 filos, sendo que a maior abundância relativa foi observada para Proteobacteria (59,8 – 69,1 %), Acidobacteria (19,3 – 10,2%), Bacteroidetes (9,7 – 10,6%) e Actinobacteria (2,0 – 3,3%) para o reator controle e reator otimizado, respectivamente (Figura 5.11A). Os filos Saccharibacteria, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia, Spirochaetes, Chlamydiae e Chloroflexi representaram menos de 4% nas duas condições dos reatores.

Os microrganismos pertencentes ao filo Proteobacteria quimioautotróficos ou heterotróficos (GUPTA, 2000). Além disso, representantes deste filo já foram relacionados à remoção de compostos recalcitrantes e alcanos de cadeias longas pela rota desnitrificante (RABUS et al 2001; BRENNER et al 2005). Nesse caso, ocorre a geração do benzoil-CoA como intermediário comum de compostos aromáticos, por exemplo (RABUS et al 2001).

Após a formação do benzoil-CoA, o anel aromático é reduzido seguido da β -oxidação da cadeia carbônica, clivagem do anel aromático e mineralização via glutaril-CoA. Os microrganismos que participam destas reações são, em sua maioria, pertencentes a subclasses β e γ -Proteobacteria (RABUS et al 2001), usam compostos de estruturas complexas, como por exemplo organocloradas. Abundância relativa maior de Gammaproteobacteria (40,14%) pertencente ao filo Proteobacteria (Figura 11A) foi observada na condição otimizada ($176,6 \pm 4,3 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$, $76,8 \pm 3,7 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $180 \pm$

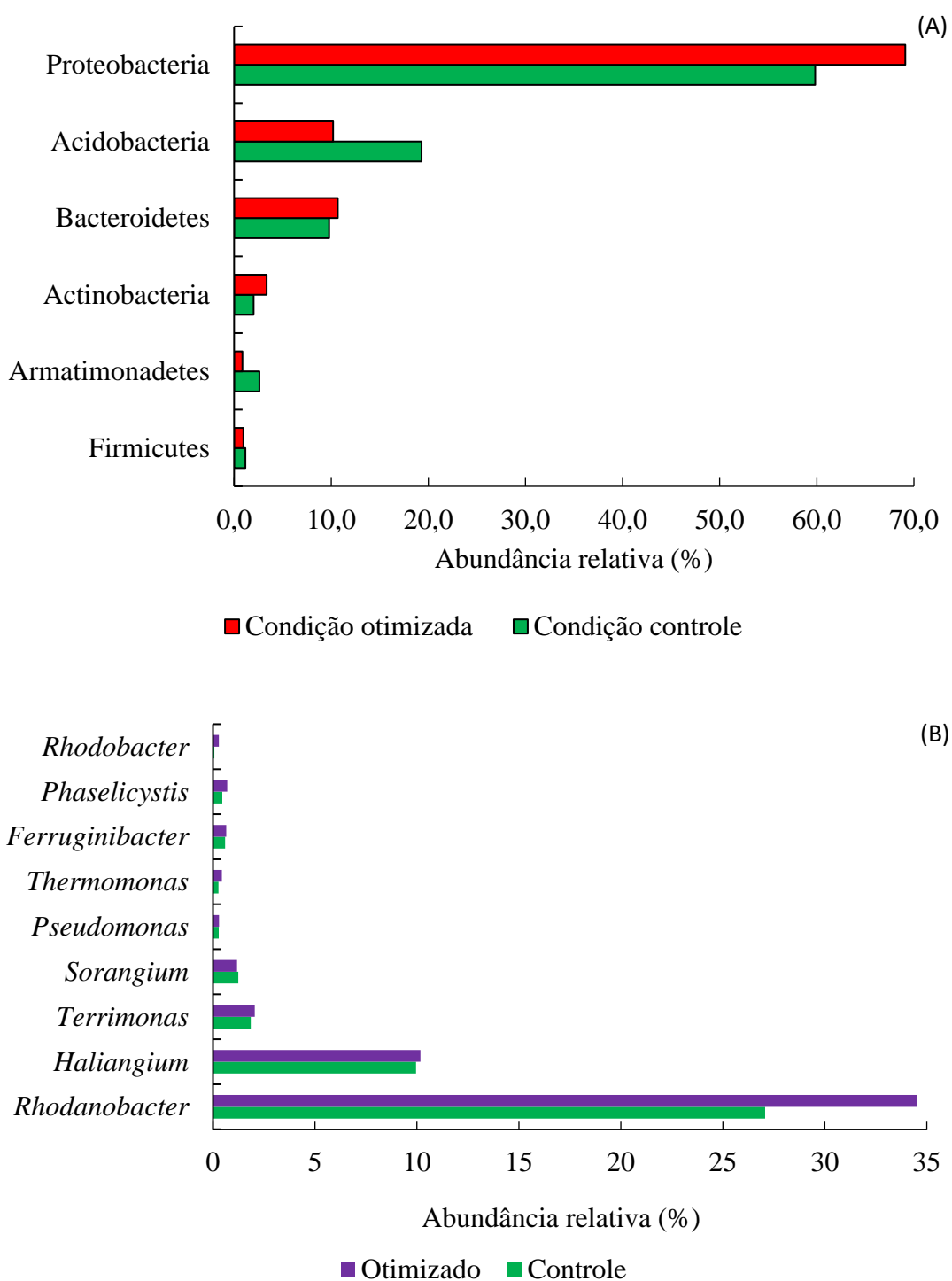
2,5 mgEtOH L⁻¹) em relação ao reator controle (149,7 ± 14,1 mgNO₃ L⁻¹ de nitrato, 150 ± 3,6 mgEtOH L⁻¹), possivelmente estas bactérias foram favorecidas pela adição do DCF.

Bactérias pertencentes ao filo Acidobacteria são heterotróficas capazes de reduzir o nitrato em condições anóxicas (WARD et al 2009). Os microrganismos pertencentes a este filo consomem ácidos orgânicos, como acético, e ainda o etanol como fonte de carbono e energia (ROSENBERG et al 2014). No entanto, foram observados valores superiores de abundância relativa para a condição controle (21%) em relação a condição otimizada (11%). Assim, é possível supor que o diclofenaco não favoreceu os organismos deste filo. O terceiro filo com maior abundância relativa em ambas as condições foi Bacteroidetes (9,7 – 10,6%), cujos representantes podem degradar compostos de alto peso molecular, tais como proteínas e carboidratos (Thomas et al, 2011).

Representantes da família Xanthomonadaceae foram identificados com 29,25% e 37,8%, respectivamente na condição controle e condição otimizada. Tais microrganismos são desnitrificantes e de metabolismo quimiorganotrófico, o que pode ter contribuído para a maior abundância relativa observada em ambas as condições. Além disso, nas condições controle e otimizada foram identificadas respectivamente as famílias Blastocatellaceae (18,63% e 9,52%), Haliangiaceae (9,96% e 9,52%), Comamonadaceae (4,68 e 4,38%), Chitinophagaceae (4,01 e 4,09%) e Saprospiraceae (3,62 e 4,14%). As famílias Fimbriimonadaceae, Polyangiaceae, Sphingomonadaceae, Gemmatimonadaceae, Hyphomonadaceae e Cytophagaceae foram observadas com abundância relativa ≤3% em ambas as condições avaliadas.

Dentre os principais gêneros identificados (Figura 5.11B) foi observada maior abundância relativa para *Rhodanobacter* (27,0 e 34,5%), *Haliangium* (9,9 e 10,1%) e *Terrimonas* (1,8 e 2,0%), para as condições controle e otimizada, respectivamente. Os gêneros *Sorangium*, *Ferruginibacter*, *Phaselicystis*, *Woodsholea*, *Pseudomonas* e *Thermomonas* foram identificados em abundância relativa ≤1%.

Figura 5.11. Abundância relativa dos filos (A) e gêneros (B) identificados nos reatores na condição controle e otimizada



Rhodanobacter foi identificada como o gênero mais abundante (27,08 – 34,53%) em ambas as condições reacionais. Neste gênero estão incluídas bactérias Gram-negativas, aeróbias e quimiorganotróficas, utilizam nitrato ou oxigênio como aceptor de elétrons (Brenner et al., 2005). Além disso, *Rhodanobacter* tem sido comumente identificado em

sistemas de lodos ativados, relacionado a sua capacidade de promover a desnitrificação em condições facultativas e degradação de compostos aromáticos, tais como compostos policíclicos aromáticos (HPA) (SONG et al., 2016), surfactantes aniônicos (Zhang et al. 2011; Okada et al., 2013; Braga et al., 2015), fenóis, tolueno e benzoato (Brenner et al., 2005; Salinero et al., 2009; Vos et al., 2009; Krieg et al., 2010), incluindo também os ácidos orgânicos voláteis (Yoshikawa et al., 2017) e fármacos anti-inflamatórios e não-esteroidais, como diclofenaco e ibuprofeno (Navrozidou et al, 2019a).

Navrozidou et al (2019b) identificaram 20% de abundância relativa de *Rhodanobacter* em biofilmes imobilizados com inóculo de lodos ativados para a degradação de diclofenaco em esgoto sanitário, a partir de 400 mg L⁻¹ do fármaco em reator de leito fixo sob operação contínua. Os autores relataram a capacidade desnitrificante do *Rhodanobacter* em condições anóxicas com elevadas concentrações do DCF (faixa de mg L⁻¹). Além disso, os autores supracitados relacionaram a maior abundância relativa deste gênero a sua capacidade de utilizar compostos recalcitrantes como fontes de carbono, além de nitrato como acceptor de elétrons.

Neste estudo, observou-se que a abundância relativa de *Rhodanobacter* foi maior no reator otimizado ($176,6 \pm 5,2$ mgNO₃ L⁻¹, $76,8 \pm 3,7$ µgDCF L⁻¹ e $180 \pm 2,5$ mgEtOH L⁻¹) em relação ao reator controle ($150 \pm 14,1$ mgNO₃⁻ L⁻¹ e $150 \pm 5,6$ mgEtOH L⁻¹). Assim como observado por Navrozidou et al (2019b), a concentração do diclofenaco ($76,8 \pm 3,7$ µg L⁻¹) e o aumento da matéria orgânica na amostra otimizada pode ter favorecido a abundância relativa deste gênero. Em relação aos parâmetros cinéticos dos reatores analisados, verificou-se que a velocidade de desnitrificação (k) na condição otimizada ($0,096$ h⁻¹) foi superior àquela da condição controle ($0,0034$ h⁻¹), com isso, é possível inferir que a maior abundância relativa de *Rhodanobacter* pode ter corroborado para o maior valor deste coeficiente cinético na reação metabólica, além de contribuído para a desnitrificação.

O gênero *Haliangium* foi identificado como um dos mais abundantes em ambas as condições avaliadas (10%). Neste gênero estão incluídas bactérias desnitrificantes heterotróficas, que utilizam nitrogênio ou oxigênio como acceptor de elétrons e assimilam ácido acético como substrato em condições anaeróbias (Chen et al., 2016). Assim, a abundância relativa observada neste estudo para este gênero pode ter sido favorecida pela disponibilidade de NO₃⁻ ($150 \pm 14,1$ mg L⁻¹) como acceptor de elétrons, e do EtOH ($150 \pm 5,6$ mg L⁻¹) como fonte de carbono facilmente degradável e doador de elétrons em ambas as amostras.

O gênero *Terrimonas* foi identificado com abundância relativa de 2% em ambas as condições. Representantes deste gênero são bactérias aeróbias, Gram-negativas e organotróficas, que reduzem o nitrato em condições anóxicas. Além disso, tais bactérias podem metabolizar hexoses e dissacarídeos (Brenner et al., 2005; Vie; Yokota, 2006; Lino et al., 2010) associados a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos recalcitrantes, como surfactantes (Braga et al., 2015) e querosene (Bacosa et al., 2010).

Zhao et al. (2019) obtiveram abundância relativa de 12% de *Terrimonas* em reator *anammox*, e observaram contribuição de tais bactérias na remoção de nitrogênio, por meio da biossíntese de polissacarídeos extracelulares hidrofóbicos (EPS) e na agregação do biofilme do consórcio microbiano *anammox*. De forma similar, representantes do gênero *Sorangium*, identificados no presente estudo com abundância relativa de 1,1% no reator controle e 1,2% no reator otimizado, podem degradar compostos aromáticos por meio da descarboxilação do anel aromático (Brenner et al., 2005).

As bactérias do gênero *Thermomonas* são Gram-negativas e filamentosas, moderadamente termofílicas e de metabolismo quimiolitotrófico. Além disso, podem crescer em meio anaeróbio na presença de nitrato como aceptor de elétrons (BRENNER et al., 2005). No presente estudo, a abundância relativa deste gênero na condição controle (0,3%) foi semelhante na condição otimizada (0,4%), sendo possível inferir que a presença do DCF não interferiu na abundância deste gênero; no entanto, a presença do nitrato foi fundamental para seu metabolismo.

Pseudomonas foi identificado em ambos os reatores com abundância relativa inferior a 1%. Este gênero assimila o nitrato como aceptor de elétrons na respiração anóxica. Os microrganismos pertencentes a este gênero possuem flexibilidade metabólica, o que implica na utilização de diversas fontes de carbono e nitrogênio (BRENNER et al., 2005). Neste estudo, tal gênero pode ter contribuído para a total remoção do nitrato em ambas as condições analisadas, devido a semelhança da abundância relativa para o reator controle (0,28%) e na condição otimizada (0,3%).

O gênero *Ferruginobacter* foi identificado em abundância relativa de 0,6% e 0,7% no reator controle e otimizado, respectivamente. Este gênero inclui bactérias Gram-negativas, que degradam compostos aromáticos em condições aeróbias como naftilfosfato e nitro-fenil-galactopiranosida (BRENNER et al., 2005). Abundância relativa de 0,04% e 0,07% de *Phaselicystis* foi observada nos reatores controle e otimizada, respectivamente. Tal gênero inclui bactérias mixotróficas, associadas com a capacidade de dessulfonação em condições anaeróbias (SHIMKETS et al., 2006).

O fármaco diclofenaco é um ácido acetilsalicílico constituído por acetato, dois grupos clorados e dois anéis aromáticos em um grupamento amina, que podem ser utilizados pelos microrganismos como fonte de carbono ou nitrogênio (ARIAS et al., 2018).

A degradação do diclofenaco em condições desnitrificantes pode ocorrer a partir da desassimilação do nitrato como acceptor de elétrons ao grupo nitrogenado da molécula de diclofenaco, resultando na formação do nitro-DCF (NO-DCF) como um composto nitroderivado intermediário. Esta reação de nitratação é considerada um processo irreversível, culminando na formação do NO₂-DCF (Barbieri et al., 2012).

Além disso, Chiron et al. (2016) observaram outra rota desnitrificante que pode culminar na degradação do diclofenaco, por meio da codesnitrificação, processo restrito em condições anóxicas, onde ocorre a remoção do nitrato e formação do óxido nitroso seguido do trióxido de nitrogênio, levando a N-nitrosação da amina do DCF.

A partir do rearranjo das N-nitrosaminas ao DCF-nitroso e na presença de nitrito, o NO-DCF é convertido em NO₂-DCF, sendo oxidado e gerando um radical de carbono, que é neutralizado pelo nitrito.

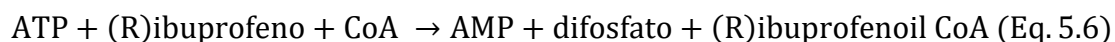
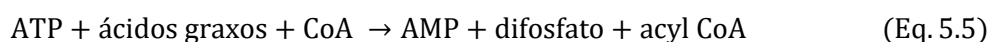
Vale ressaltar a importância da adição de etanol como co-substrato, uma vez que em condições desnitrificantes, o etanol e também o fumarato podem ser utilizados como doadores de elétrons, mantendo suficiente ATP no sistema por meio da adição de co-substratos, favorecendo a fosforilação do diclofenaco (GONZALEZ-GIL et al., 2016; DELFORNO et al., 2019; GRANATTO et al., 2020a).

Outra possível rota de degradação do diclofenaco refere-se à ω -oxidação do grupo metila terminal, seguida pela β -oxidação do grupo carboxílico da estrutura molecular do composto organoclorado (BOUJU et al, 2016).

Além disso, ocorre a clivagem oxidativa das unidades de carbono, gerando a abertura do anel para-acetil-CoA e intermediários ácidos, seguindo para sua oxidação a CO₂. Este mecanismo é semelhante em outros compostos aromáticos, como o surfactante LAS (Lara-Martin et al., 2010). *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Syntrophobacter* são alguns dos principais gêneros associados a esta etapa em ambientes anaeróbios, especialmente à ω/β -oxidação, dessulfonação e clivagem de anéis aromáticos (DELFORNO et al., 2017, 2019).

O diclofenaco (C₁₄H₁₁Cl₂NO₂) é um composto com mais de dez carbonos, que além de seus anéis aromáticos, podem ser utilizados como substrato para a enzima α -methylacyl-CoA racemase [5.1.99.4]. Além disso, vale ressaltar a importância da catalase [1.11.1.6], que atua como uma pseudoperoxidase [1.11.1.7] em diversas substâncias orgânicas, com

grande afinidade pelo etanol como doador de hidrogênio, formando acetaldeído por meio desta reação. A adição da Coenzima A ao longo da degradação do DCF ocorre devido a ação da enzima long-chain-fatty-acid-CoA ligase [6.2.1.3], por meio da oxidação de um octano, como o phenylacetate ($C_8H_8O_2$), que pode ocorrer pelas reações descritas nas Equações 5.5 e 5.6.

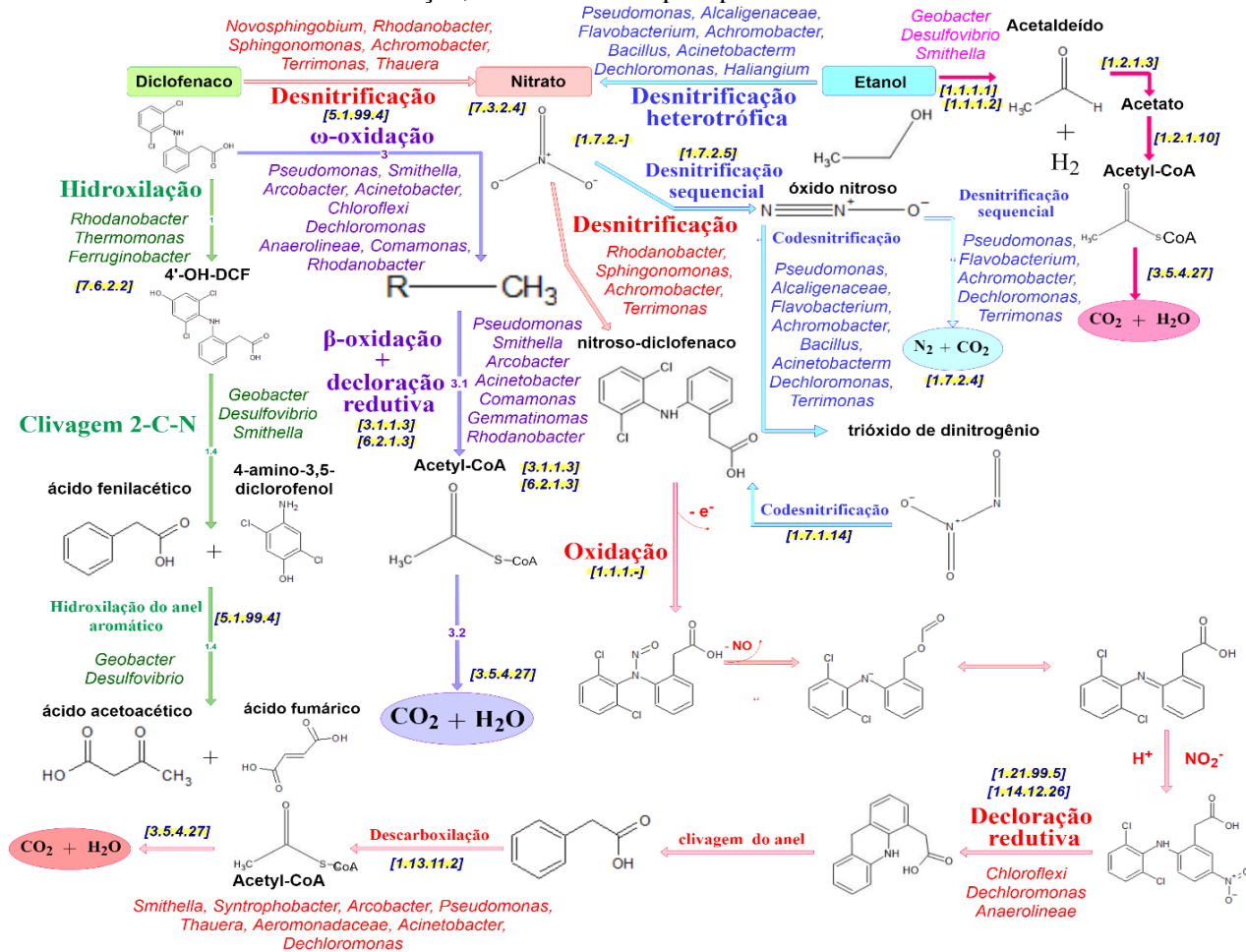


Em estudos conduzidos por Jewell et al (2016) foram selecionadas reações de hidroxilação e descarboxilação como principais rotas de transformações da molécula de DCF em lodos ativados. Na molécula do fármaco, o anel aromático clorado pode ser hidroxilado, gerando o 4'-OHDCF.

Em seguida, este metabólito intermediário é descarboxilado, seguido pela conjugação do grupo carboxílico do 4'-OHDCF para a hidroxila, formando um grupo aminoclorado e ácido fenilacético (BOUJU et al, 2016).

Os possíveis mecanismos de degradação do diclofenaco encontram-se resumidos na Figura 5.12, assim como os possíveis gêneros envolvidos em cada processo de transformação da molécula.

Figura 5.12. Vias metabólicas envolvidas na degradação de DCF em reatores em batelada contendo etanol e nitrato. Os números EC apresentados entre colchetes, referentes às enzimas potencialmente envolvidas em cada reação, foram inferidos pelo pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6 e via base de dados BRENDA.



5.3. Ensaio com ibuprofeno

5.3.1 Ensaio controle de remoção de ibuprofeno em diferentes condições nutricionais

Ensaio definidos como condições controle foram realizados para verificar o potencial de degradação do ibuprofeno em diferentes concentrações do fármaco, nitrato e etanol. As seguintes condições foram avaliadas nos reatores em batelada: ibuprofeno (controle 1), ibuprofeno e etanol (controle 2) e ibuprofeno e nitrato (controle 3). As concentrações de cada condição, bem como, os resultados obtidos de remoção de ibuprofeno e etanol, e a adsorção do fármaco estão listados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Desempenho operacional dos reatores controle.

Reator	Concentração inicial	Remoção de ibuprofeno (%)	Adsorção de ibuprofeno (%)	Remoção etanol (%)
Controle 1	$122 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$	$16,5 \pm 1,4$	0,3	-
Controle 2	$114 \pm 16 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 191,4 \pm 22 \text{ mgEtOH L}^{-1}$	$15,2 \pm 7,3$	0,7	$95,5 \pm 6,4$
Controle 3	$106 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 99 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$	$9,0 \pm 3,3$	0,4	-

Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição controle em triplicata.

Na biomassa de lodos ativados utilizada como inóculo dos reatores foi observado $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno. A remoção deste fármaco foi de 16,5%; 15,2% e 9% nas condições operacionais dos reatores controle 1 ($122 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$), controle 2 ($114 \pm 16 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 191,4 \pm 22 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) e controle 3 ($106 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 99 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$).

A partir da obtenção de eficiências similares de remoção de ibuprofeno nos ensaios controle 1 e 2 ($16,5 \pm 1,4$ e $15,2 \pm 7,3\%$, respectivamente), foi possível inferir que a adição de etanol não favoreceu em maior remoção do fármaco. Em comparação ao controle 3 ($106 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$ e $99 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$) na ausência do etanol observou-se menor eficiência de remoção do fármaco ($9,0 \pm 3,3\%$). De forma similar aos resultados observados no presente estudo, Granatto et al. (2020) avaliaram o efeito do etanol como co-substrato

orgânico (200 mg L^{-1}) na remoção de ibuprofeno ($6,11 \pm 0,01 \text{ mgIBU L}^{-1}$), em reatores em bateladas sob condições anaeróbias. Os autores observaram ácido acético (40 mg L^{-1}) e remoção do fármaco de $18,7 \pm 1,6\%$, enquanto no presente estudo (controle 2), a remoção de ibuprofeno foi de $15,2 \pm 7,3\%$, além da concomitante produção de $73,9 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido acético.

Entretanto, Abu Hasan et al. (2016) avaliaram a remoção do ibuprofeno ($39 \text{ } \mu\text{gIBU L}^{-1}$) em reatores em bateladas sob condições desnitrificantes e inoculados com esgoto sanitário suplementado com glicose ($1200 \text{ mgDQO L}^{-1}$) como co-substrato e $63,00 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato, e obtiveram remoção de ibuprofeno superior a 90% e remoção completa do nitrato. Sendo assim, nota-se que sob as condições avaliadas pelos autores supracitados a adição de co-substrato orgânico foi favorável à remoção de tal fármaco, tendo em vista que no presente estudo (controle 3), apenas $9,0 \pm 3,3\%$ de ibuprofeno foram removidos, enquanto no controle 2, o etanol favoreceu a remoção do ibuprofeno em $15,2 \pm 7,3\%$.

No controle 3 ($106 \pm 2 \text{ } \mu\text{gIBU L}^{-1} + 99 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$) não houve remoção da matéria orgânica a partir de $36 \pm 2,3 \text{ mgDQO L}^{-1}$ (valor inicial), enquanto o nitrato foi totalmente reduzido via desnitrificação e o ibuprofeno foi removido em $9,0 \pm 3,3\%$. Vale ressaltar que não houve acúmulo de ácidos orgânicos no sistema, sendo este um resultado comum em condições desnitrificantes (SHEN et al., 2013).

Na condição controle 1 (somente ibuprofeno), não foi observada remoção de matéria orgânica. Observou-se o aumento de tal parâmetro de $52 \pm 6,2 \text{ mgDQO L}^{-1}$ (valor inicial) para $227,6 \pm 4,9 \text{ mgDQO L}^{-1}$ (valor final), sendo que a matéria orgânica equivalente de ibuprofeno adicionada nestas condições foi de $0,3 \text{ mgDQO L}^{-1}$ (Tabela 5.9). Tal fato pode ser justificado pela ocorrência da lise ou morte celular com posterior disponibilização de material orgânico para a fração líquida (Figura 5.13-A). Além disso, Min et al. (2018) obtiveram 3% de adsorção do ibuprofeno a partir de $100 \text{ } \mu\text{gIBU L}^{-1}$ no inóculo de lodos ativados em reatores em batelada sob condições aeróbias. Tais observações foram semelhantes ao presente estudo (controle 1, $114 \text{ } \mu\text{gIBU L}^{-1}$), sendo observado 0,4% de adsorção do ibuprofeno. Conforme os autores supracitados, além do coeficiente de partição octanol/água, o potencial de eletronegatividade da molécula é a principal propriedade de sorção com as partículas superficiais de lodos ativados.

De forma similar, nas condições do reator controle 2 ($114 \pm 16 \text{ } \mu\text{gIBU L}^{-1} + 191,4 \pm 22 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol) não foi observada remoção de matéria orgânica a partir de $366 \pm 16 \text{ mgDQO L}^{-1}$ inicial. No entanto, a remoção de etanol foi de 97%, o que pode indicar a

conversão do etanol em ácidos orgânicos voláteis, majoritariamente em ácido acético (73,9 mg L⁻¹), propiônico (43,7 mg L⁻¹) e em ácido valérico (4,6 mg L⁻¹), por conseguinte manutenção de matéria orgânica constante durante o experimento (Figura 5.13-B e 5.13-C).

Tabela 5.9. Reações de oxidação e equivalentes teóricos de etanol e ibuprofeno.

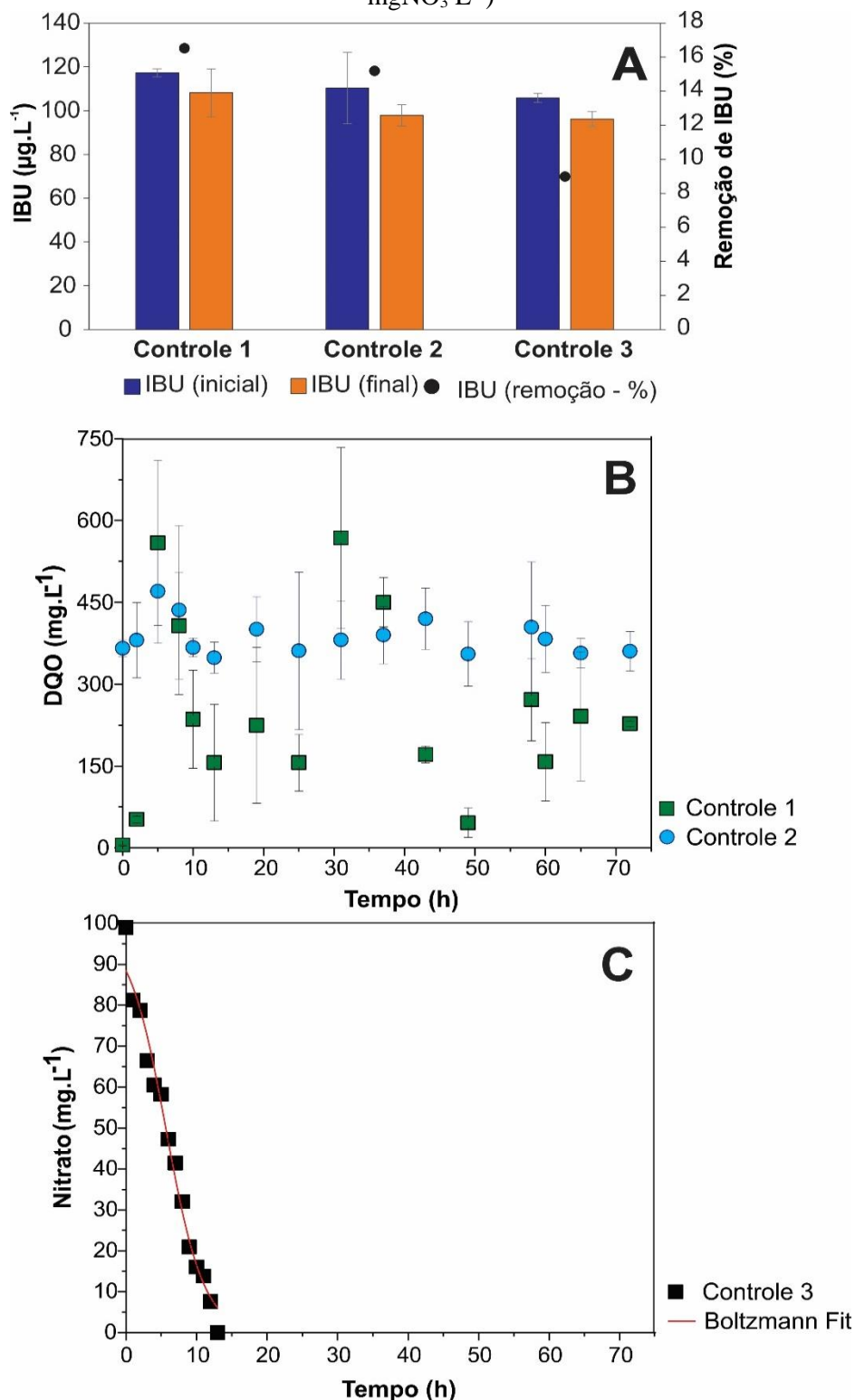
Substrato	Massa molar (g mol ⁻¹)	Reação de oxidação	Fator equivalente
Etanol (C ₂ H ₆ O)	46,07	C ₂ H ₆ O+3O ₂ → 2CO ₂ + 3H ₂ O	2,09 gDQO gEtOH ⁻¹
Ibuprofeno (C ₁₃ H ₁₈ O ₂)	206,28	2 C ₁₃ H ₁₈ O ₂ + 33 O ₂ → 26 CO ₂ + 18 H ₂ O	2,56gDQO gIBU ⁻¹

Em todos os ensaios foi observado pH inicial e final próximos à neutralidade. Conforme Plósz et al. (2012) e Salgado et al. (2012), a biomassa de lodos ativados tem carga negativa em pH neutro. Tal processo pode favorecer a repulsão eletrostática entre o ibuprofeno com as partículas e sítios superficiais de adsorção da biomassa usada como inóculo. Dessa forma, a adsorção do ibuprofeno na biomassa foi de 0,3%; 0,3% e 0,4% para os reatores controle 1 (ibuprofeno), controle 2 (ibuprofeno + etanol) e controle 3 (ibuprofeno + nitrato), respectivamente.

Embora, a molécula de ibuprofeno tenha tendência média de adsorção a biomassa, conforme o coeficiente de partição octanol/água (log Kow = 3,9), esta possibilidade não foi a principal rota de remoção do fármaco. Biel-Maeso et al. (2019) também observaram menor valor de coeficiente de adsorção do ibuprofeno em solos agrícolas em condição aeróbia. De acordo com os autores, a adsorção depende principalmente da interação eletrostática entre o ibuprofeno com a superfície de contato. No estudo conduzido com solo cuja composição majoritária era de argila carregada negativamente em pH 7, possibilitou a repulsão eletrostática do ibuprofeno, uma molécula polar.

Dessa forma, com a operação dos ensaios controle na condição 3 foi possível observar a remoção de ibuprofeno em condições desnitrificantes. No entanto, com o intuito de estudar a otimização e a interação entre o nitrato, ibuprofeno e etanol na remoção do fármaco, seguiu-se o delineamento do composto central para análise destas três variáveis independentes e obtenção da condição mais favorável de remoção e degradação do ibuprofeno para possível aplicação futura em processos de biorremediação seja em reatores em batelada ou contínuos.

Figura 5.13. Valores iniciais, finais e percentual de remoção de ibuprofeno (A), matéria orgânica (B) e nitrato (C) dos reatores em batelada nas condições controle 1 ($122 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$), controle 2 ($114 \pm 16 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 191,4 \pm 22 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) e controle 3 ($106 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1} + 99 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$)



5.3.2 Otimização da remoção de ibuprofeno em ensaios do DCCR

As condições previstas dos ensaios em bateladas via DCCR foram realizadas a partir da avaliação dos efeitos de cada variável independente, a saber: nitrato ($95,9 \pm 5,0$ a $264 \pm 6,0$

mg L⁻¹); ibuprofeno (41±5,6 a 122,8±5,0 µg L⁻¹) e etanol (95,3±21,9 a 233,3±0,2 mg L⁻¹) (Tabela 5.10). Em função das condições de cada ensaio foi observada remoção de ibuprofeno de 14,3 a 97,5%.

Tabela 5.10 Eficiência de remoção de ibuprofeno dos reatores em batelada dos ensaios do DCCR

Ensaio	Variáveis independentes (X)			Variável resposta (Y)	
	Nitrato (x ₁ , mg L ⁻¹)	Ibuprofeno (x ₂ , µg L ⁻¹)	Etanol (x ₃ , mg L ⁻¹)	Remoção de Ibuprofeno (%)	Adsorção de Ibuprofeno (%)
1	130,0±13,9	82±13,1	210,0±8,2	86,8 ±10,2	0,8
2	130,0±13,2	41±5,6	144,6±2,4	80,9 ± 6,4	1,1
3	260,2±2,6	49,3±2,7	207,7±25,6	84,5 ± 15,7	1,0
4	261,8±7,7	82,8±0,8	158,2±31,7	62,8 ± 18,3	0,3
5	134,2±2,9	100±1,2	130,5±1,5	85,0 ± 2,7	0,7
6	216,0±26,4	100±0,5	226,8±0,1	35,8 ± 1,4	2,6
7	241,5±4,6	97,7±5,7	146±3,6	59,8 ± 2,6	0,8
8	140,0±3,8	85,2±7,9	213±2,5	31,1 ± 11,3	0,2
9	143,0±23,2	67,2±3,9	203±6,7	28,8 ± 3,5	0,5
10	97,5±5,0	109,9±1,6	180,8±11	97,5 ± 3,1	0,8
11	264,0±6,0	93,8±9,1	110,7±15,6	15,4 ± 6,0	0,1
12	168,6±6,8	122,8±5,0	98,4±0,1	14,3 ± 5,6	0,2
13	165,6±3,5	95,7±10,3	233,3±0,2	15,9 ± 8,8	0,2
14	160,2±13,0	91,3±1,7	95,3±21,9	38,2 ± 5,4	0,3
15	180,0±13,9	105,2±6,8	157,1±32,6	23,6± 2,1	0,5
16	177±63,6	90,5±2,1	182±5,3	21,7± 0,5	0,5
17	174,4±1,7	108,7±11	179,8±9,8	20,6± 3,3	0,5
18	192±7,7	117±2,1	151,7±4,2	24,6 ± 6,3	0,5
19	166,3±1,6	110±4,2	197,2±9,7	20,7 ± 5,2	0,5

Os erros apresentados após as médias (±) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.

A remoção máxima de ibuprofeno foi obtida no ensaio 10 (97,5 ± 3,1%) com 95,9 ± 5,0 mg L⁻¹ de nitrato, 109,9 ± 1,6 µg L⁻¹ de ibuprofeno e 180,8 ± 11,0 mg L⁻¹ de etanol.

Todavia, no ensaio 12 houve menor remoção do fármaco ($14,3 \pm 5,6\%$) a partir de $168,6 \pm 6,8 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato, $122,8 \pm 5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno e $98,4 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol. Provavelmente, a condição do ensaio 12 com maior concentração de nitrato e menor concentração de matéria orgânica foi adversa à remoção do ibuprofeno.

Nos ensaios via DCCR, a adsorção do ibuprofeno na biomassa foi inferior a 3% em todas as condições. É possível inferir que os menores valores de adsorção ocorreram devido ao aumento da repulsão eletrostática entre a biomassa e as moléculas de ibuprofeno; portanto, a adsorção não foi considerada como via de remoção do fármaco. Pomiès et al. (2014) observaram resultados similares em biomassa de lodos ativados, cuja adsorção de ibuprofeno ($40,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) foi inferior a 5%.

A partir da regressão linear múltipla dos dados experimentais do delineamento obteve-se a equação ajustada do modelo reparametrizado que contém apenas os termos estatisticamente significativos para p -valor $< 0,1$ referente a remoção de ibuprofeno como resposta do modelo (Equação 5.7).

$$Y = 25,7 - 25,4x_1 + 79,2x_1^2 - 6,9x_2 - 12,4x_2^2 + 9,5x_1x_2 + 41,1x_1x_3 \quad (\text{Eq. 5.7})$$

Sendo,

Y = remoção de ibuprofeno (%);

x_1 = concentração inicial de nitrato, como efeito linear (mg L^{-1});

x_1^2 = efeito quadrático da concentração inicial de nitrato;

x_2 = concentração inicial de ibuprofeno, como efeito linear ($\mu\text{g L}^{-1}$);

x_2^2 = efeito quadrático da concentração inicial de ibuprofeno;

x_1x_2 = interação entre x_1 e x_2 ;

x_1x_3 = interação entre x_1 e x_3 .

Os coeficientes de regressão foram calculados (Tabela 5.11) e obtida a análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 90% (p -valor $< 0,1$) (Tabela 5.12). Os efeitos individuais da concentração de nitrato, ibuprofeno e etanol, bem como as interações das variáveis independentes foram observadas como resposta para a remoção do ibuprofeno (Tabela 5.12).

Tabela 5.11. ANOVA para os efeitos de nitrato (x_1), ibuprofeno (x_2) e etanol (x_3) da remoção de ibuprofeno.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{calc}	p-valor
Regressão	11623,7	6	2280,9	9,7	0,00076
Resíduos	283,5	41	273,1		
Falta de ajuste	10065	7	1437,8	31,3	0,0000
Erro puro	1558,7	34	45,85		
Total	41031,9	50			

O valor calculado do coeficiente F a partir da interação entre a regressão e resíduos foi de 9,7 que é maior do que o F_{tabelado} (1,8) para 6 graus de liberdade na regressão e 41 nos resíduos. Ademais, nota-se que a falta de ajuste do modelo foi significativa com p-valor $< 0,1$. Assim, observou-se que o modelo reparametrizado foi significativamente ajustado.

Os efeitos dos parâmetros independentes foram analisados, a saber: concentração inicial de nitrato (x_1), concentração inicial de ibuprofeno (x_2) e concentração inicial de etanol (x_3) (Tabela 5.12). O termo linear e quadrático da variável nitrato (x_1 e x_1^2) e ibuprofeno (x_2 e x_2^2), assim como a interação do nitrato com o ibuprofeno (x_1x_2) e com o etanol (x_1x_3) foram estatisticamente significativos ao nível de 90% ($p < 0,1$). Além disso, via equação da regressão (Equação 5.6) nota-se que maiores eficiências de remoção do fármaco foram observadas em menores concentrações de nitrato e ibuprofeno (x_1 e x_2).

Shen et al. (2015) verificaram em reatores em bateladas sob condições desnitrificantes, que a degradação da piridina foi significativamente relacionada ao nitrato. Ademais, o composto recalcitrante (500 mg L^{-1}) foi utilizado como doador de elétrons para a biomassa desnitrificante segundo a rota metabólica proposta. As observações relatadas pelos autores citados podem ser correlacionadas com os resultados obtidos no presente estudo; ou seja, a piridina também contém um anel aromático em sua estrutura, semelhante à composição do ibuprofeno, além disso, a remoção máxima do ibuprofeno ($97,5 \pm 3,1\%$; para $109,9 \pm 1,6 \mu\text{g IBU L}^{-1}$ inicial) foi observada nas condições contendo $95,9 \pm 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato e $180,8 \pm 11,0 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol.

A superfície de resposta tridimensional (Figura 5.14) foi elaborada com base no modelo polinomial. Por meio desta análise obteve-se os valores máximos de remoção do ibuprofeno em função da concentração inicial de nitrato ($95,9 \pm 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $264 \pm 6,0 \text{ mg L}^{-1}$

¹), concentração inicial de ibuprofeno ($41 \pm 5,6 \mu\text{g L}^{-1}$ a $122,8 \pm 5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e concentração inicial de etanol ($95,3 \pm 21,9 \text{ mg L}^{-1}$ a $233,3 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabela 5.12 Coeficientes de regressão para a remoção de ibuprofeno

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(34)	p-valor	Estimativas por Intervalo (90%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	25,71	2,25	11,41	0,0000*	21,90	29,52
x ₁ (L)	-25,45	4,56	-11,16	0,0000*	-58,62	-43,19
x ₁ (Q)	79,25	10,31	15,37	0,0000*	141,06	175,93
x ₂ (L)	-6,93	4,97	-2,78	0,0085*	-22,27	-5,46
x ₂ (Q)	-12,45	9,40	-2,64	0,0122*	-40,81	-8,99
x ₃ (L)	-1,65	4,17	-0,79	0,4345	-10,35	3,75
x ₃ (Q)	0,23	6,18	0,07	0,9404	-9,99	10,93
x ₁ x ₂	9,57	11,27	1,69	0,0987*	0,07	38,21
x ₁ x ₃	41,13	9,86	8,34	0,0000*	65,59	98,95
x ₂ x ₃	7,54	9,38	1,60	0,1171	-0,78	30,94

*Efeito significativo a 90% de confiança. L= efeito linear; Q= efeito quadrático. x₁= nitrato; x₂= ibuprofeno; x₃= etanol.

Conforme a análise dos resultados obtidos via planejamento experimental (Tabela 5.10 e Figura 5.14) observa-se para etanol na faixa entre $95,3 \pm 21,9 \text{ mg L}^{-1}$ a $180,8 \pm 11 \text{ mg L}^{-1}$, que a remoção do fármaco (Y_{resposta}) foi mais sensível às variações da sua própria concentração inicial. No entanto, em concentrações superiores de etanol ($182 \pm 5,3$ a $233,3 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$), a remoção do ibuprofeno foi superior ($80 \pm 10,2\%$ – $90 \pm 3,1\%$), além de menos susceptível a variações na concentração inicial do fármaco. Portanto, foi possível inferir que maiores concentrações de etanol a partir de 180 mg L^{-1} foram favoráveis à remoção do ibuprofeno.

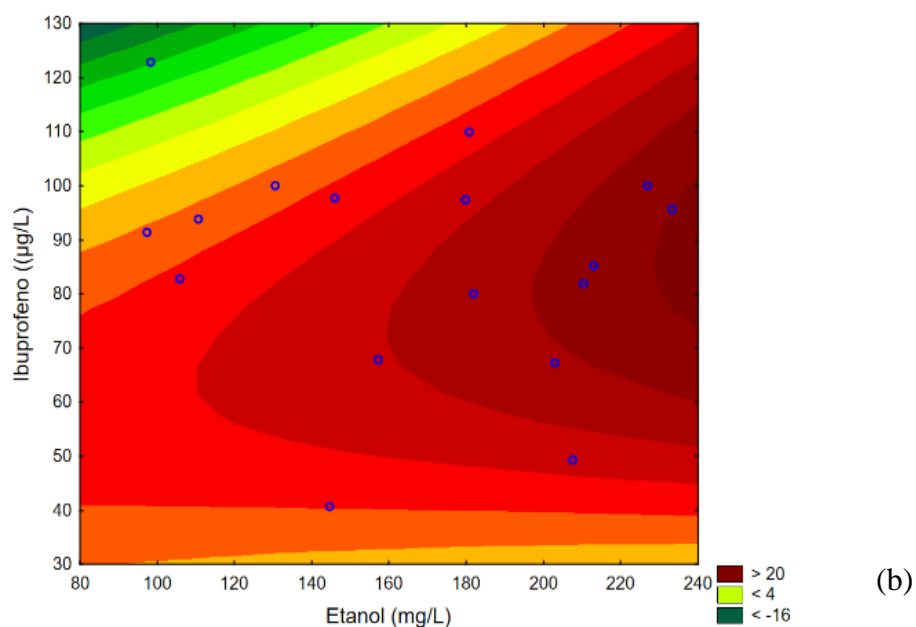
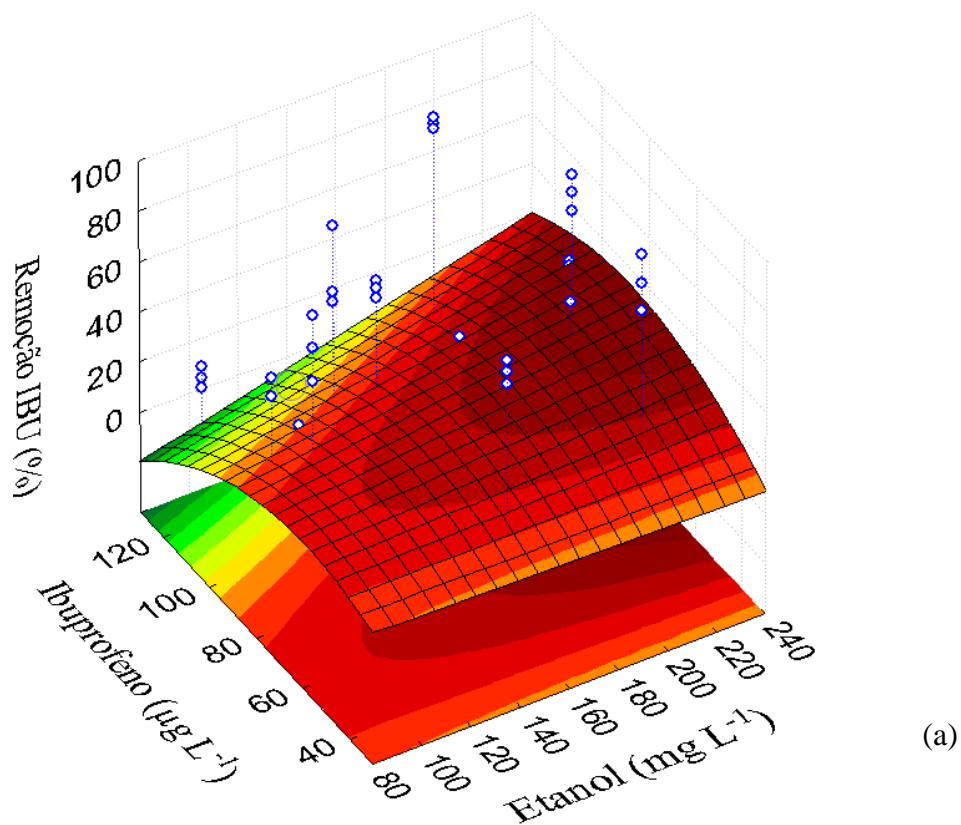
Bragança et al. (2016) obtiveram 90% de degradação de ibuprofeno ($3,0 \text{ mg IBU L}^{-1}$) a partir de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de pentano como co-substrato em reatores em batelada inoculados com esgoto sanitário e lodos ativados. Conforme os autores, o co-substrato foi fundamental para o cometabolismo e para maior adaptação da biomassa ao fármaco, uma vez que nas condições sem o pentano, a remoção do ibuprofeno foi inferior (44%) a partir de $3,0 \text{ mg IBU L}^{-1}$. Sob tal estudo, pode-se corroborar com as observações preditas no ensaio 10 ($95,9 \pm 3,1 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$ + $95,9 \pm 5,0 \mu\text{g IBU L}^{-1}$ + $180,8 \pm 11 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol) no qual se obteve $97,5 \pm 3,1\%$ de remoção de ibuprofeno, enquanto para a condição sem o co-substrato (controle 3) a remoção foi de $9,0 \pm 3,3\%$ a partir de $106 \pm 2 \mu\text{g IBU L}^{-1}$ inicial.

Kamal et al. (2020) avaliaram o efeito da concentração da glicose (sem glicose até 150 mg L^{-1}) em reatores em bateladas inoculados com biomassa de lodos ativados com o fármaco anticonvulsivo gabapentina, 1-aminometil-ciclohexano-ácido acético (10 mg L^{-1}). Os autores reportaram que em condições com a suplementação de 150 mg L^{-1} de glicose como co-substrato, a remoção do fármaco foi de 97%, enquanto nos ensaios com o fármaco como única fonte de carbono, a remoção foi de 23,3%. Assim como o ibuprofeno, a gabapentina é composta por um anel aromático formado por grupamentos carboxila e anel ciclohexano (Datel and Hrabankova, 2020; Kamal et al., 2020), cujo arranjo molecular é similar à composição estrutural do anti-inflamatório ibuprofeno. Sendo assim, os resultados reportados pelos autores supracitados foram similares aos obtidos no presente estudo, uma vez que a remoção (80 – 90%) do ibuprofeno foi maior para $95,3 \pm 21,9 \text{ mg L}^{-1}$ a $233,3 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol, conforme nos ensaios 1 ao 3 e 10.

Em contrapartida, observa-se que em concentração superior a $197,2 \pm 9,7 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol, a eficiência de remoção do fármaco (15,9%) foi inferior em relação as demais condições. Neste caso, em condições de elevada concentração de etanol, foi observada menor remoção do ibuprofeno, principalmente a partir do ponto axial de $233,3 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Provavelmente, nessa condição não houve o cometabolismo e houve o uso preferencial do composto orgânico biodegradável em detrimento ao composto recalcitrante, uma vez que a remoção do etanol foi máxima no ensaio 13, em comparação com as demais condições, a partir de $233,3 \pm 0,2 \text{ mg EtOH L}^{-1}$ com eficiência de remoção de $74,0 \pm 8,0\%$.

A partir da análise da superfície resposta (Figura 5.14) observa-se que a remoção do ibuprofeno foi maior (80% – 90%) para a faixa inicial de $41 \pm 5,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a $108,7 \pm 11 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno em baixas concentrações de nitrato ($95,9 \pm 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ – $134,2 \pm 2,9 \text{ mg L}^{-1}$). Enquanto na condição experimental com maior concentração de nitrato ($264,0 \pm 6,0 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$), $93,8 \pm 9,1 \text{ } \mu\text{g IBU L}^{-1}$ e $110,7 \pm 15,6 \text{ mg EtOH L}^{-1}$ a remoção do ibuprofeno foi mínima ($15,4 \pm 6,0\%$). Portanto, observa-se que as faixas ótimas de nitrato ($95,9 \pm 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ – $134,2 \pm 2,9 \text{ mg L}^{-1}$) culminaram em maior remoção do fármaco.

Figura 5.14 Superfície de resposta (A) e superfície de contorno (B) para a remoção de ibuprofeno em função da concentração de ibuprofeno e etanol.



A partir dos resultados obtidos, nota-se que etanol e nitrato favoreceram a remoção do ibuprofeno. Tang et al. (2020) também utilizaram biomassa aeróbia proveniente de lodos ativados em reatores em bateladas. Além disso, os autores reportaram a degradação do

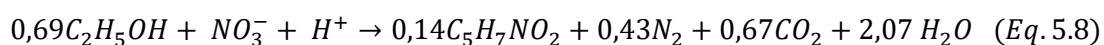
ibuprofeno ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) superior a 90% sob condições desnitrificantes com nitrato (20 mg L^{-1}) e metanol (500 mgDQO L^{-1}). Torresi et al. (2019) sustentaram a hipótese que o co-substrato, como fonte de carbono facilmente biodegradável, pode favorecer a maior remoção cometabólica de fármacos anti-inflamatórios.

Dessa forma, ressalta-se que a biomassa de lodos ativados, utilizado nessa pesquisa, foi composta por características mistas e constituída por bactérias aeróbias, nitrificantes e desnitrificantes, o que proporcionam maior versatilidade em função de ampla diversidade de populações (Tang et al., 2020; Torresi et al., 2019).

De forma similar ao presente estudo, Müller et al. (2013) avaliaram os efeitos da adição de co-substrato orgânico (acetato, $12,0$ a $88,0 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrato ($0,3$ a $2,6 \text{ mg L}^{-1}$) na remoção do antibiótico sulfametoxazol, utilizando biomassa de lodos ativados como inóculo. Sob tais condições, os autores supracitados reportaram que o fármaco foi usado via desnitrificação com remoção completa de nitrato.

No presente estudo também foi observada remoção completa de nitrato em todas as condições preditas via DCCR. Apesar do arranjo molecular mais complexo da molécula do sulfametoxazol em relação ao ibuprofeno, percentuais de remoção similares foram observados em ambos os estudos ($\geq 90\%$), além de adsorção inferior a 2% na biomassa dos reatores. Nos ensaios de DCCR a adsorção do ibuprofeno foi entre 0,1% (ensaio 11; $93,8 \pm 9,1 \mu\text{gIBU L}^{-1}$) a 2,6% (ensaio 6; $100 \pm 0,5 \mu\text{gIBU L}^{-1}$).

O consumo total de nitrato, verificado em todas as condições avaliadas via DCCR, provavelmente foi favorecido pelo etanol nos reatores em batelada. Tal hipótese pode ser confirmada pela relação estequiométrica da desnitrificação heterotrófica do etanol, como fonte de carbono, e do nitrato como aceptor de elétrons (Equação 5.8).

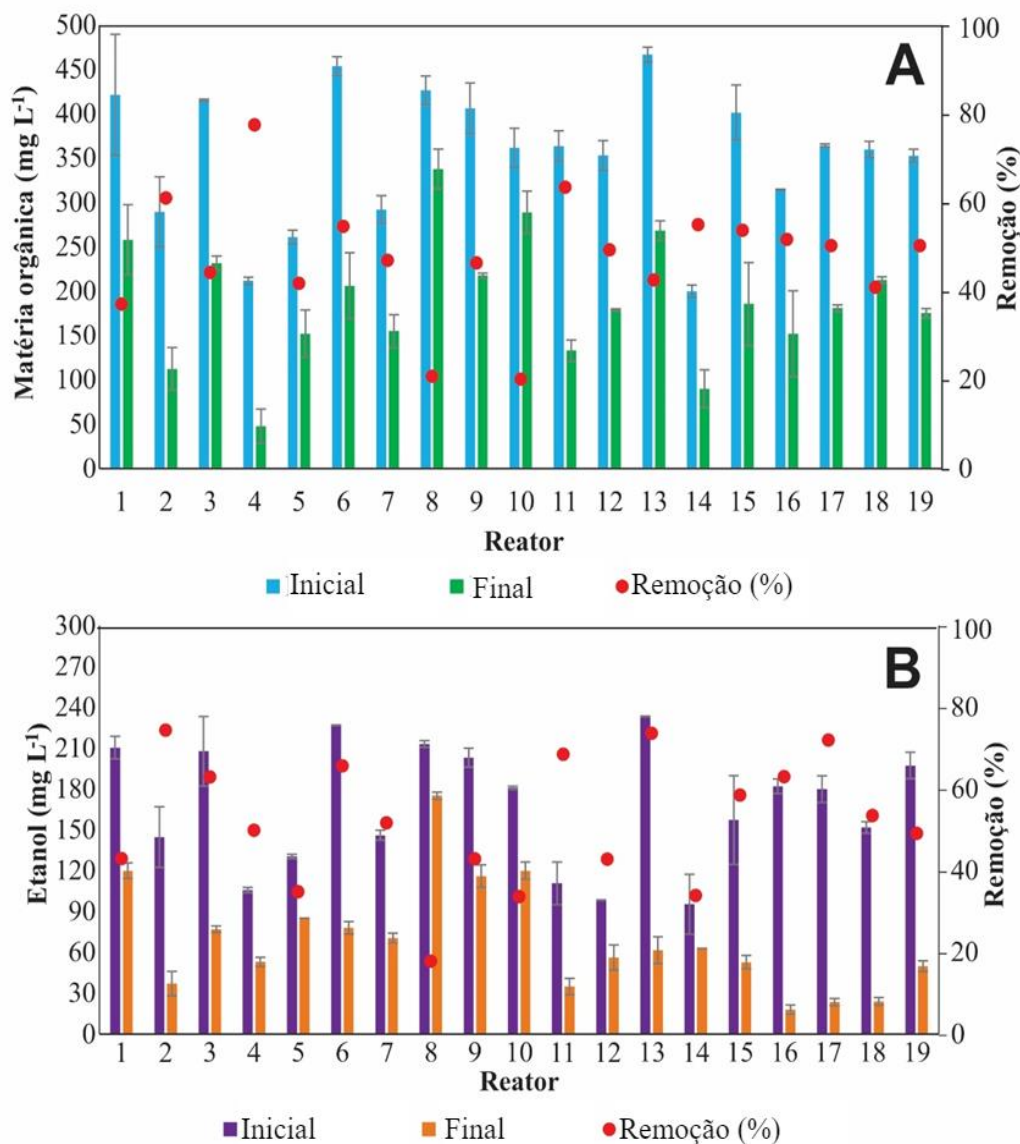


A maior eficiência de remoção de matéria orgânica foi verificada no ensaio 4 ($77,4 \pm 9,0\%$) e ensaio 2 ($60,9 \pm 8,2\%$) para concentração inicial de $211,7 \pm 1,1 \text{ mgDQO L}^{-1}$ e $289,3 \pm 39,7 \text{ mgDQO L}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.15-A). Em relação à remoção de etanol (Figura 5.15-B), a maior eficiência foi obtida também no ensaio 4 ($71,3 \pm 7,2\%$) para $158,2 \pm 31,7 \text{ mgEtOH L}^{-1}$ inicial.

A maior remoção do ibuprofeno ($97,5 \pm 3,1\%$) foi observada no ensaio 10 ($97,5 \pm 3,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$; $109,9 \pm 1,6 \mu\text{gIBU L}^{-1}$; $180,8 \pm 11 \text{ mgEtOH L}^{-1}$), com $20,2 \pm 5,0\%$ de remoção de matéria orgânica (inicial de $361,4 \pm 22,0 \text{ mgDQO L}^{-1}$) e $35,2 \pm 6,4\%$ de remoção de etanol (inicial de $180,8 \pm 11 \text{ mgEtOH L}^{-1}$). A remoção de ibuprofeno ($41 \pm 5,6$

$\mu\text{g L}^{-1}$ a $82\pm 13,1 \mu\text{g L}^{-1}$) ocorreu em menores concentrações de nitrato ($95,9\pm 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $130,0\pm 13,9 \text{ mg L}^{-1}$) e etanol ($180,8\pm 11 \text{ mg L}^{-1}$ a $226,8\pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$).

Figura 5.15. Valores de matéria orgânica (A) e etanol (B) dos ensaios de DCCR. Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.



5.3.3 Balanço geral da remoção de ibuprofeno dos reatores em batelada em condições controles e DCCR

Na Tabela 5.13 são elucidadas as eficiências de remoção biológica e de adsorção do ibuprofeno para cada condição via DCCR. Observa-se que a contribuição por adsorção foi inferior a 3% na totalidade de degradação nas condições avaliadas. Desse modo, a remoção do ibuprofeno ocorreu preferencialmente pela degradação.

Tabela 5.13 Remoção, adsorção e degradação do ibuprofeno em reatores em batelada. Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.

Ensaio	Concentração inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Remoção (%)	Adsorção (%)	Degradação (%)
1	82,0 \pm 13,1	86,6 \pm 10,2	0,8 \pm 0,2	85,8 \pm 2,4
2	41,0 \pm 5,6	80,5 \pm 6,4	1,1 \pm 0,0	79,4 \pm 6,0
3	49,3 \pm 2,7	84,6 \pm 15,7	1,0 \pm 0,0	83,6 \pm 15,7
4	82,8 \pm 0,8	63,0 \pm 18,3	0,3 \pm 0,0	62,7 \pm 18,3
5	100,0 \pm 1,2	77,0 \pm 2,7	0,7 \pm 0,2	76,3 \pm 2,7
6	100,0 \pm 0,5	35,8 \pm 1,4	2,7 \pm 0,0	33,1 \pm 1,4
7	97,7 \pm 5,7	56,7 \pm 2,6	0,2 \pm 0,0	56,6 \pm 2,6
8	85,2 \pm 7,9	27,7 \pm 11,3	0,2 \pm 0,0	27,5 \pm 11,3
9	67,2 \pm 3,9	31,7 \pm 3,5	0,5 \pm 0,0	31,2 \pm 3,5
10	109,9 \pm 1,6	97,5 \pm 3,1	0,2 \pm 0,0	97,4 \pm 3,1
11	93,8 \pm 9,1	19,9 \pm 6,0	0,01 \pm 0,0	19,9 \pm 6,0
12	122,8 \pm 5,0	16,0 \pm 0,8	0,2 \pm 0,0	15,8 \pm 0,8
13	95,7 \pm 10,3	21,1 \pm 8,8	0,2 \pm 0,0	20,9 \pm 8,8
14	91,3 \pm 1,7	42,2 \pm 5,4	0,4 \pm 0,2	41,8 \pm 5,4
15	105,2 \pm 6,8	22,2 \pm 2,1	0,5 \pm 0,0	21,8 \pm 2,1
16	90,5 \pm 2,1	21,0 \pm 0,5	0,6 \pm 0,0	20,4 \pm 0,5
17	108,7 \pm 11,0	20,6 \pm 4,6	0,5 \pm 0,1	20,1 \pm 4,6
18	117,0 \pm 2,1	25,6 \pm 5,2	0,6 \pm 0,0	25,1 \pm 5,2
19	110,0 \pm 4,2	20,0 \pm 2,3	0,6 \pm 0,0	19,4 \pm 2,3
controle 1	122,1 \pm 1,8	16,5 \pm 1,4	0,3 \pm 0,1	15,8 \pm 7,4
controle 2	114,2 \pm 16,4	15,7 \pm 7,3	0,3 \pm 0,2	13,9 \pm 5,3
controle 3	105,8 \pm 2,0	9,0 \pm 3,2	0,7 \pm 0,0	7,7 \pm 0,2
otimizado	104,1 \pm 2,4	60,8 \pm 7,3	0,4 \pm 0,1	60,4 \pm 1,3

5.3.3 Remoção de nitrato nas condições DCCR

Os valores de nitrato e o ajuste médio do modelo foi correspondente a cinética de ordem zero com $R^2 \geq 97\%$ (Figura 5.16) para todos os ensaios do DCCR. Conforme a equação que representa matematicamente o modelo sigmoidal Boltzmann foi possível analisar os parâmetros cinéticos (Tabela 5.14), nos quais A1 refere a concentração inicial de nitrato (mg L^{-1}) e dx (h^{-1}) é a velocidade de remoção do nitrato no sistema.

Figura 5.16. Variação temporal da remoção de nitrato dos ensaios de DCCR: (A) ensaios 1-3, (B) 4-6, (C) 7-9, (D) 10-12, (E) 13 e 14 e (F) 15-19. Os erros apresentados após as médias (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado para cada condição em triplicata.

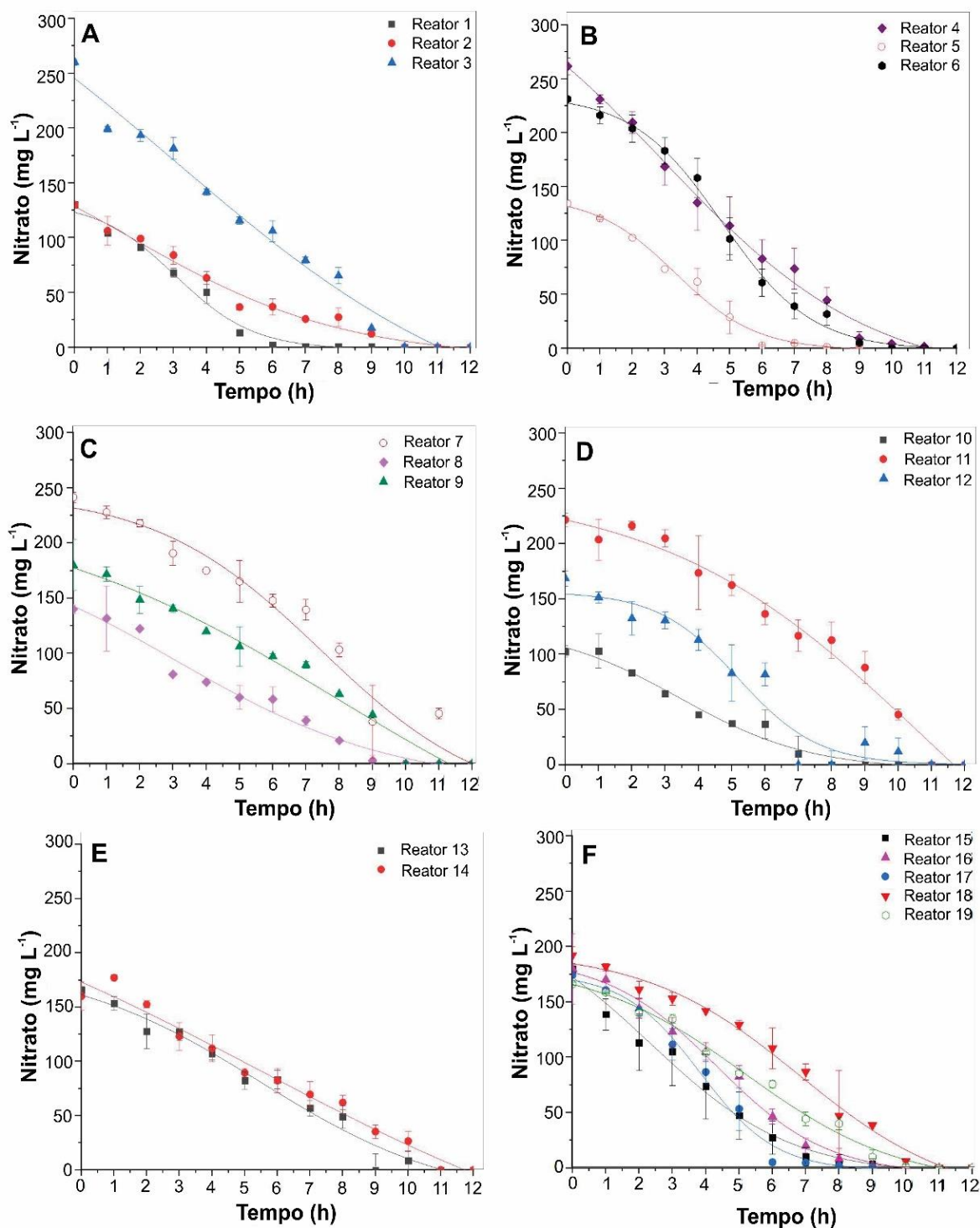


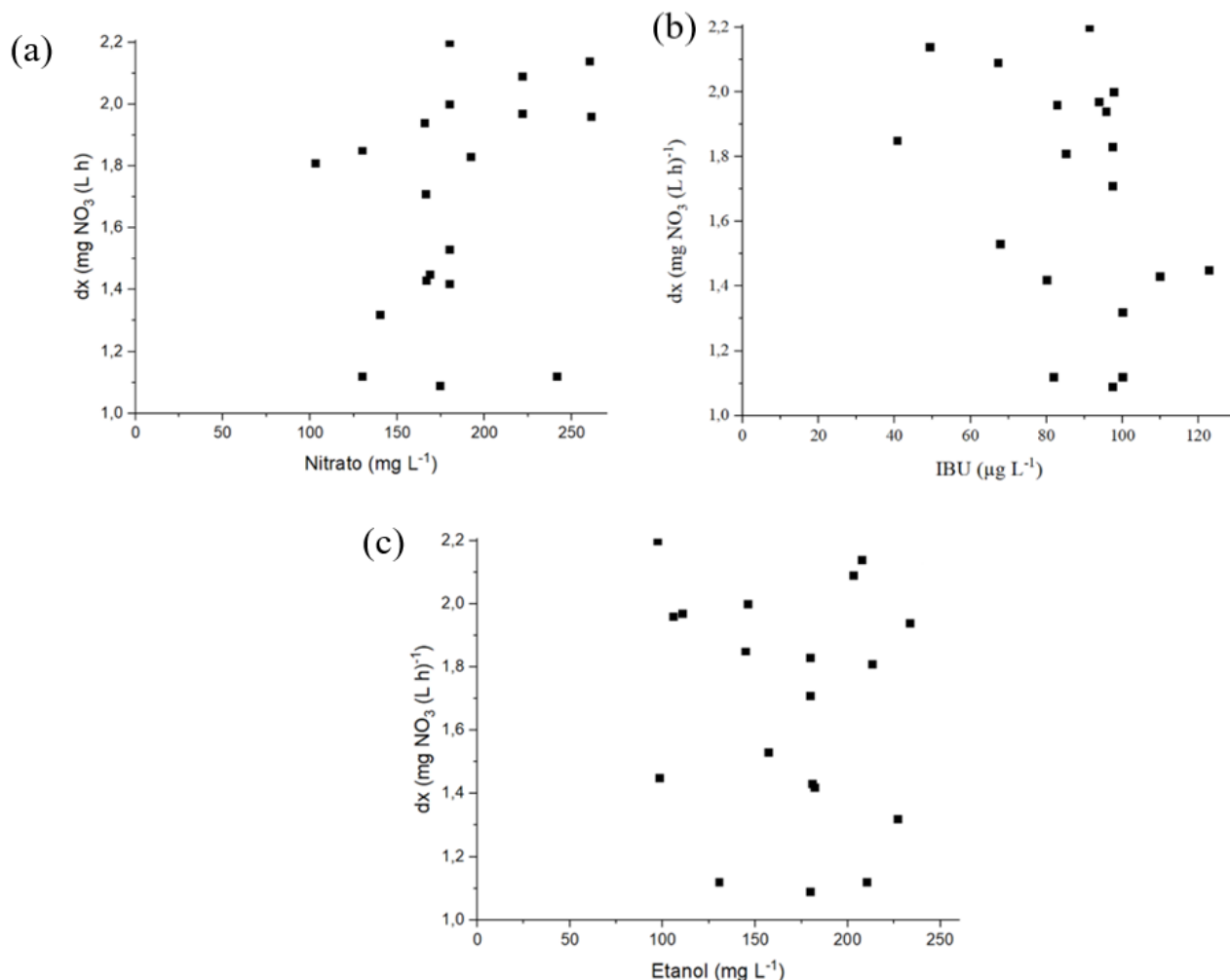
Tabela 5.14 Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada do DCCR da remoção de nitrato. A₁= concentração inicial de nitrato; dx= velocidade de remoção de nitrato.

Ensaio	A ₁ (mg L ⁻¹)	dx (h ⁻¹)	R ²
1	130,0±13,9	1,1	98
2	130,0±13,2	1,8	97
3	260,2±2,6	2,1	96
4	261,8±7,7	1,9	98
5	134,2±2,9	1,1	99
6	216,0±26,4	1,3	94
7	241,5±4,6	2,0	97
8	140,0±3,8	1,8	96
9	143,0±23,2	2,1	97
10	95,9±5,0	1,4	96
11	264,0±6,0	1,9	94
12	168,6±6,8	1,4	96
13	165,6±3,5	1,9	98
14	160,2±13,0	2,2	98
15	180,0±13,9	1,5	98
16	177±63,6	1,4	99
17	174,4±1,7	1,1	99
18	192±7,7	1,8	98
19	166,3±1,6	1,7	98

A máxima velocidade de remoção de nitrato (2,1 h⁻¹) foi verificada no ensaio 3 (260,2±2,6 mgNO₃ L⁻¹; 49,3±2,7 µgIBU L⁻¹; 207,7±25,6 mgEtOH L⁻¹), enquanto o menor valor (1,1 h⁻¹) foi obtido para o ensaio 17 (174,4±1,7 mgNO₃ L⁻¹; 108,7±11 µgIBU L⁻¹; 179,8±9,8 mgEtOH L⁻¹). As interações entre a velocidade de remoção do nitrato com as variáveis independentes (nitrato, ibuprofeno e etanol) estão apresentadas na Figura 5.17,

sendo observada aleatoriedade para dx nas condições aplicadas do planejamento experimental.

Figura 5.17. Velocidade de remoção de nitrato (dx) em relação às variáveis de concentração de nitrato (A), ibuprofeno (B) e etanol (C).



Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, a partir de $41 \pm 5,6$ a $114,6 \pm 2,4$ μg L⁻¹ de ibuprofeno, Zhou et al. (2019) observaram 85% de remoção de nitrato e remoção de ibuprofeno (1,0 a 5,0 mg L⁻¹) superior a 40% em reator em bateladas sequenciais. Sob tais condições, foi observado que a adição de ibuprofeno não teve efeitos sobre a desnitrificação, mesmo para máxima concentração do fármaco (5,0 mg IBU L⁻¹).

De forma contrária, Ozdemir et al. (2015) observaram alteração do potencial desnitrificante a partir de 100 μg L⁻¹ de diclofenaco em reatores em bateladas sob condições anóxicas com a utilização de glicose (300 mg L⁻¹) como co-substrato e 100 mg L⁻¹ de

nitrato. Segundo os autores supracitados, houve o acúmulo de nitrato a partir de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco, o que resultou em alteração contínua da biomassa desnitrificante. De forma similar ao ibuprofeno, o diclofenaco também é um anti-inflamatório com arranjo químico estrutural composto pelo grupo carboxílico e anel aromático.

No presente estudo a partir de $110,7 \pm 15,6 \mu\text{gIBU L}^{-1}$, não foi observado efeito da concentração do ibuprofeno na remoção do nitrato, ao contrário do que foi observado pelos autores supracitados com o diclofenaco.

5.3.4 Validação experimental

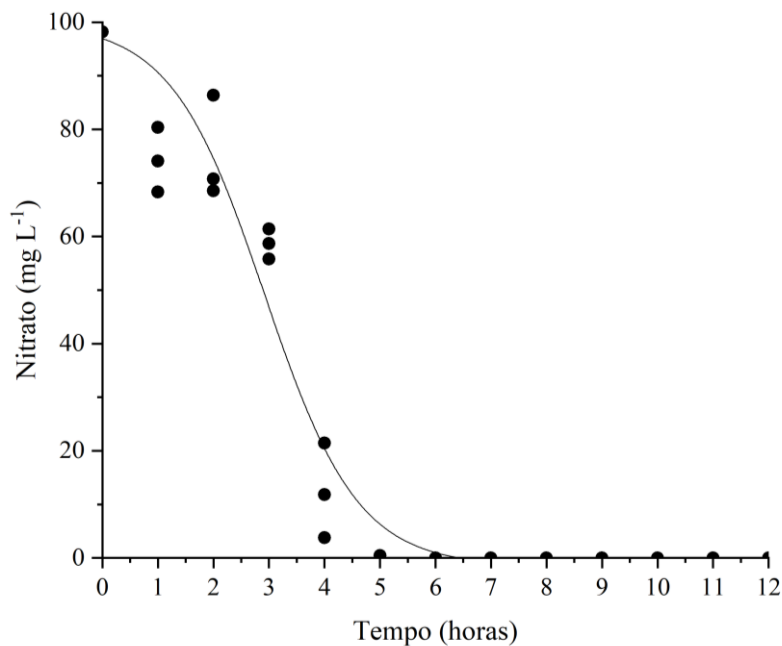
A validação foi realizada a fim de avaliar e confirmar a remoção do ibuprofeno via modelo estatístico na condição de máxima eficiência. Para tanto, foram realizados ensaios com $100,9 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$; $104,2 \pm 2,4 \mu\text{gIBU L}^{-1}$; $110,6 \pm 15,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. Nesta condição otimizada, observou-se remoção completa de nitrato e $60,5 \pm 7,4\%$ de remoção de ibuprofeno (Figura 5.18). Sob tais condições, obteve-se $1,1 \text{ h}^{-1}$ de velocidade de remoção de nitrato e coeficiente de regressão (R^2) de 97%.

A desnitrificação ocorreu na presença de etanol e ibuprofeno como substratos orgânicos via remoção do nitrato como aceptor de elétrons.

A remoção da matéria orgânica foi de $20 \pm 2,7\%$ a partir de $366,5 \pm 3,5 \text{ mgDQO inicial L}^{-1}$, semelhante ao obtido na condição de maior remoção do fármaco (ensaio 10) com $21,50 \pm 3,1\%$, a partir de $95,9 \pm 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato, $109,9 \pm 1,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno e $180,8 \pm 11 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol.

Em relação à análise estatística, houve 70% de precisão em relação ao predito com $60,5 \pm 7,4\%$ de remoção de ibuprofeno. Os valores obtidos para a velocidade de remoção do nitrato de $1,1 \text{ h}^{-1}$ (Figura 5.18) e remoção matéria orgânica ($20 \pm 2,7\%$) foram semelhantes ao ensaio 10; ou seja $1,4 \text{ h}^{-1}$ e $20,2 \pm 5,0\%$, respectivamente, que resultou na maior remoção de ibuprofeno ($97,5\%$) via desnitrificação.

Figura 5.18. Variação temporal da remoção de nitrato em reator em batelada da condição otimizada com ibuprofeno ($104,2 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$), etanol ($110,6 \pm 15,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) e nitrato ($100,9 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$).



5.3.6 Diversidade microbiana

A caracterização microbiana para Domínio Bacteria foi realizada para a biomassa ao final das bateladas das quatro condições: controle 1, com ibuprofeno ($122 \pm 2 \mu\text{gIBU L}^{-1}$); controle 2, com ibuprofeno ($114 \pm 16 \mu\text{g L}^{-1}$) e etanol ($191,4 \pm 22 \text{ mg L}^{-1}$); controle 3 com ibuprofeno ($106 \pm 2 \mu\text{g L}^{-1}$) e nitrato ($99 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e condição otimizada com ibuprofeno ($104,2 \mu\text{g L}^{-1}$), etanol (180 mg L^{-1}) e nitrato ($95,9 \text{ mg L}^{-1}$).

Em relação à curva de rarefação, foi observado platô com representação das populações do Domínio Bacteria (Figura 5.19). O número de sequências e ASV (Amplicon Sequencing Variants), bem como os índices de diversidade, encontram-se resumidos na Tabela 5.15. Menor índice de Chao-1 foi observado para as condições do reator controle 1 (167,25), o que pode estar relacionado com a ausência de etanol e nitrato, a qual culminou em menor diversidade microbiana. Delforno et al. (2019) e Zhao et al. (2019) obtiveram menores valores de tal índice em condições com o surfactante aniônico LAS (Delforno et al., 2019) e 4-clorofenol (Zhao, 2019) como única fonte de substrato.

Figura 5.19. Curva de rarefação da distribuição populacional microbiana. Controle 1= IBU; controle 2= ibuprofeno + etanol; controle 3= ibuprofeno + nitrato; condição otimizada= ibuprofeno+ etanol + nitrato

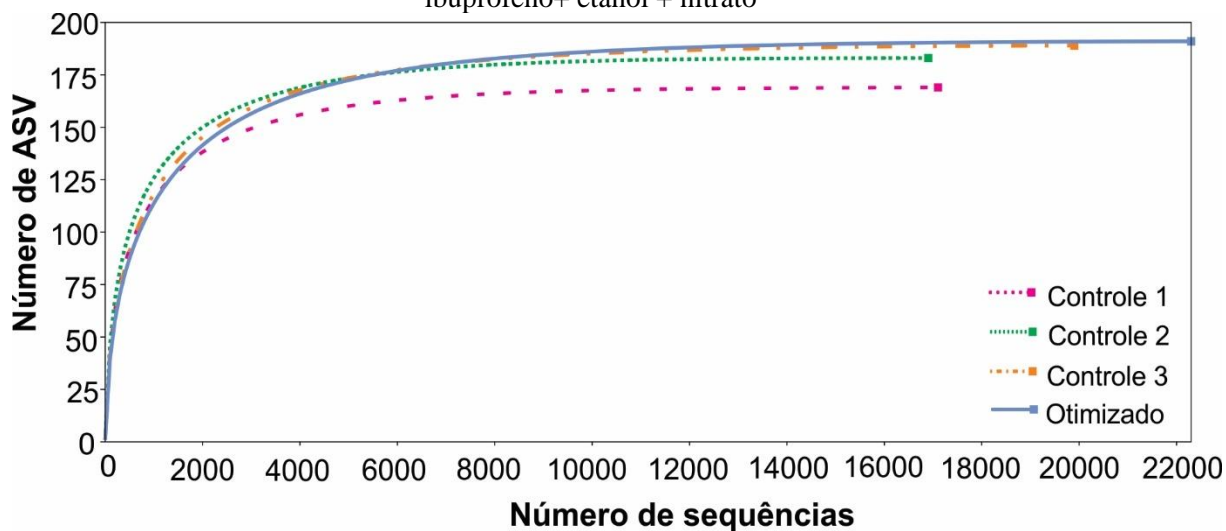


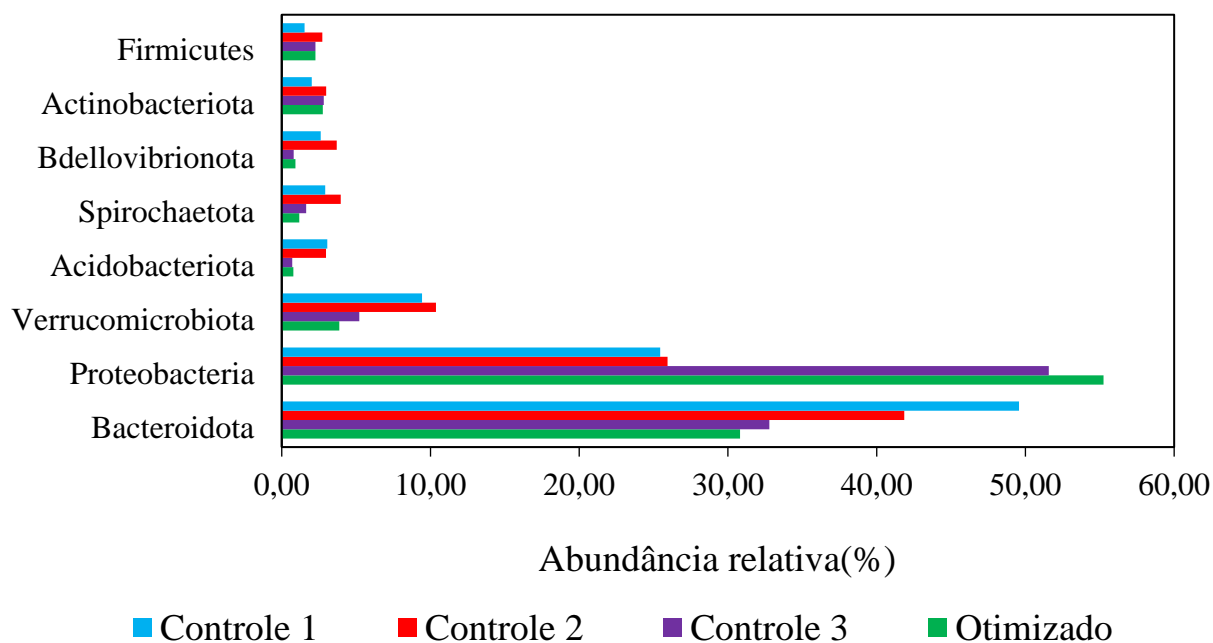
Tabela 5.15 Índices de diversidade do Dominio Bacteria

Dados do 16S rRNA	Condição CR 1	Condição CR 2	Condição CR 3	Condição otimizada
Número de sequências	17258	17298	20013	22426
Comprimento dos pares de bases	± 450	± 450	± 450	± 450
Total de OTU's	170	178	189	190
Shannon	3,90	4,04	3,77	3,59
Chao-1	167,25	181	190	188,63

Os filos em abundância relativa superior a 1,0% em todas as amostras analisadas foram Bacteroidetes (30,8 – 49,6%), Proteobacteria (25,4 – 55,2%), Verrucomicrobiota (3,9 – 10,4%), Acidobacteriota (0,7 – 3,1%), Spirochaetota (1,2 – 4,0%), Bdellovibrionota (0,80 – 3,70%), Actinobacteriota (2,0 – 3,0%) e Firmicutes (1,5 – 2,7%) (Figura 5.20).

Para Bacteroidetes, obteve-se abundância relativa de 49,6% nas condições do ensaio controle 1, com ibuprofeno. Representantes deste filo compreendem microrganismos hidrolíticos e fermentativos amplamente identificados em reatores mesofílicos e relatados pela capacidade de metabolizar moléculas orgânicas, tais como proteínas e carboidratos (Brenner et al., 2005; Granatto et al., 2020).

Figura 5.20. Distribuição dos gêneros nos diferentes ensaios: Controle 1= ibuprofeno; controle 2= ibuprofeno + etanol; controle 3= ibuprofeno + nitrato; condição otimizada= ibuprofeno + etanol + nitrato



Bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria (25,4 – 55,2%) são associadas à capacidade de degradação de compostos aromáticos recalcitrantes, como surfactantes (Andrade et al., 2020; Dornelles et al., 2020) e fármacos anti-inflamatórios (Kruglova et al., 2014; Tiwari et al., 2019). Bactérias conhecidamente desnitrificantes pertencem a este filo (Kong et al., 2013; Philippot, 2002), sendo assim, nas condições com nitrato pode ter favorecido estes organismos, uma vez que sua abundância relativa foi maior em condições anóxicas, como no controle 3 (51,57%), além da condição otimizada (55,5%).

As principais famílias e/ou gêneros identificados nas diferentes condições analisadas encontram-se resumidos na Figura 5.21. No ensaio controle 1, com ibuprofeno, bactérias semelhantes à *Chujaibacter* (Bacteroidetes), Chitinophagaceae (Bacteroidetes) e Pedosphaeraceae (Verrucomicrobiota), Rikenellaceae (Bacteroidetes) foram identificadas em maior proporção, com 11,9; 4,5; 4,3 e 3,5%, respectivamente. Representantes de Spirochaetaceae, Synergistaceae (Synergistetes), além de *Ruminofilibacter*, *Aurantisolimonas*, “Blvii28_wastewater-sludge_group”, *Syntrophomonas*, *Petrimonas*, *Fluviicola*, *Pedobacter*, *Zoogloea* e *Pseudomonas*, com abundâncias relativas inferiores a 1,0% também foram identificados. Na biomassa do reator controle 2 (ibuprofeno + etanol) foram identificados *Chujaibacter*, “37-13” (Bacteroidetes), Pedosphaeraceae (Verrucomicrobiota) e Rikenellaceae (Bacteroidetes) em maior abundância relativa, de

11,2; 9,7; 5,3 e 4,3%, respectivamente. Além disso, sob tais condições, foram também observadas *Pedobacter*, “Blvii28_wastewater-sludge_group” e *Fluviicola*, com abundâncias relativas $\leq 2,0\%$. De forma similar, no reator controle 3 (ibuprofeno e nitrato) foram identificados em maior abundância relativa *Chujaibacter*, *Pedobacter*, “37-13” (Bacteroidetes), Pedosphaeraceae (Bacteroidetes), de 7.9, 7.7, 4.4 e 3.0%, respectivamente. *Aurantisolimonas* (Bacteroidetes), *Taibaiella* (Bacteroidetes) e *Fluviicola* (Bacteroidetes) também foram identificadas com abundância relativa $\leq 2,0\%$. Por fim, na condição otimizada (etanol, ibuprofeno e nitrato), foram observados em maior abundância relativa os gêneros *Pedobacter*, *Chujaibacter*, “37-13” (Bacteroidetes) e *Aurantisolimonas*, com 7,2; 6,0; 3,8 e 2,5%, respectivamente, além de *Taibaiella*, *Fluviicola*, *Flavobacterium* com abundância relativa $\leq 1,0\%$.

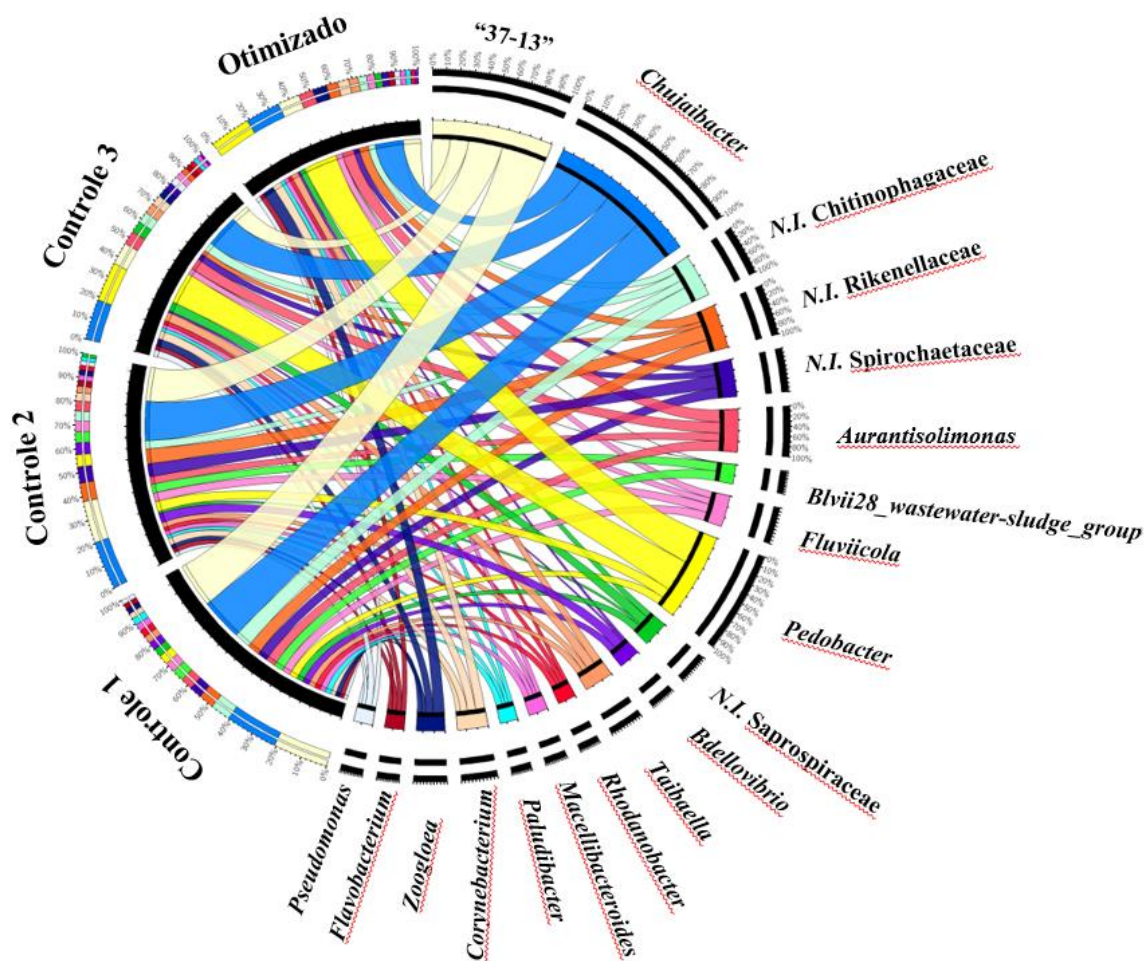
Apesar de não ter sido observada variação da abundância relativa de *Chujaibacter* nas condições do reator controle 1 (11,9%) e controle 2 (11,2%), verificou-se redução desta abundância nas condições do reator controle 3 (7,9%) e no reator da condição otimizada (6,0%). Sabe-se que membros deste gênero são capazes de assimilar a N-acetilglicosamina, realizar a oxidação da amônia e matéria orgânica (Kim et al., 2015). Sobretudo, estes microrganismos não reduzem o nitrato, o que pode justificar a menor abundância relativa observada nas condições de nitrato do reator controle 3 e condição otimizada. Rodriguez-Sanchez et al. (2018) e Xin et al. (2021) identificaram este gênero com abundância relativa semelhante a esta pesquisa (12%) em biorreatores de membranas com sistemas híbridos aplicados ao tratamento de águas residuárias, com inóculo de lodos ativados, semelhante ao inóculo utilizado nesta pesquisa.

Na condição otimizada, foi observado o gênero “C39” com maior abundância relativa (24,7%). Estes microrganismos realizam a degradação de compostos aromáticos e remoção de nitrogênio em sistemas de tratamento de efluentes (Hesselsoe et al., 2009; Kong et al., 2016). Semelhante ao presente estudo, Chen et al. (2019) identificaram maior abundância relativa deste gênero após a adição de nitrato em água residuária rural, proveniente do Dianchi Lake (China). Os autores associaram as bactérias “C39” com a capacidade de remoção de nitrato e degradação dos poluentes, além de provavelmente contribuírem para a formação e maturação do biofilme.

Diferenças não foram observadas em relação à abundância do gênero *Pedobacter* para os controles 1 e 2 (2,18 - 2,85% respectivamente). No entanto, foi observado aumento de sua abundância relativa em reatores com a suplementação de nitrato (controle 3) e na condição otimizada. Representantes deste gênero são desnitrificantes, além de produtores

de oxidases e catalases. Cao et al. (2014) associaram os membros deste gênero com a resistência a antibióticos, além da degradação de fármacos, semelhante ao observado por Tiwari et al. (2019) em efluente sintético hospitalar com ibuprofeno e estradiol.

Figura 5.21. Representação gráfica dos gêneros identificados nas amostras do reator controle 1 (ibuprofeno); controle 2 (ibuprofeno + etanol); controle 3 (ibuprofeno + nitrato); condição otimizada (ibuprofeno + etanol + nitrato).



Em relação aos gêneros de bactérias desnitrificantes identificados em abundância relativa $\geq 1\%$ em todas as amostras, destacam-se *Pseudomonas*, *Zoogloea* e *Dechloromonas*. Sobretudo, com abundância relativa $\leq 1\%$, foram identificados os gêneros *Acinetobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio*, *Geobacter* e *Mycobacterium*. Microrganismos semelhantes a *Pseudomonas* são anaeróbios facultativos, desnitrificantes e capazes de consumir o etanol por meio da enzima álcool desidrogenase (Brenner et al., 2005; Schomburg et al., 2017). Este gênero realiza também a ω - β -oxidação e clivagem de anéis aromáticos (Centurion et al., 2018; Dornelles et al., 2020; Macedo et al., 2020).

Sequências semelhantes à *Dechloromonas* foram identificadas com maior abundância relativa no reator controle 3 e na condição otimizada. Trata-se de bactérias facultativas, capazes de utilizar o etanol como fonte de carbono, e nitrato como aceptor de elétrons (Brenner et al., 2005). Bactérias do gênero *Zoogloea* são aeróbias e realizam a desnitrificação heterotrófica, com assimilação de ácidos orgânicos e álcoois. A abundância relativa deste gênero foi mais expressiva na condição otimizada (2,44%) seguido pelo controle 3 (1,73%).

Pseudomonas, *Dechloromonas* e *Zoogloea* foram previamente associados à capacidade de degradação de compostos aromáticos recalcitrantes (Andrade et al., 2020; de Oliveira et al., 2010; Macedo et al., 2020). Vale ressaltar que estes microrganismos foram identificados em maior abundância relativa na presença de nitrato (controle 3 e condição otimizada) por serem desnitrificantes heterotróficos. Provavelmente, houve contribuição destes gêneros na degradação do ibuprofeno. Bactérias semelhantes a *Zoogloea* tem sido identificadas em diversas configurações reacionais para remoção de compostos fenólicos (Evgenidou et al., 2015) e surfactantes aniônicos (Andrade et al., 2020; Granatto et al., 2019; Macedo et al., 2020). Nesta pesquisa, a abundância relativa foi superior a 1% em todas as condições, cujo valor máximo obtido foi na condição otimizada (2,4%).

Bactérias do gênero *Acinetobacter* (Proteobacteria) são Gram-negativas, aeróbias e metabolicamente versáteis, capazes de mineralizar compostos aromáticos e promover a oxidação do etanol (Brenner et al., 2005). Representantes deste gênero foram associados à capacidade de degradação e tolerância a altas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e de metais pesados (Czarny et al., 2020). Liu et al. (2020) relacionaram a predominância deste gênero à degradação de compostos fenólicos, via hidroxilase que catalisa a reação de orto-clivagem pela β -oxidação com a formação do catecol e ácido succínico como principais produtos de degradação. Nesta pesquisa, este gênero foi identificado em maior abundância relativa na presença de etanol (controle 2 e condição otimizada - 0,1%). No entanto, bactérias deste gênero não foram identificadas no reator controle 1 (contendo apenas ibuprofeno), indicando sua prevalência sob condições contendo o co-substrato orgânico. De acordo com Nemeč et al. (2021), tais bactérias podem utilizar o etanol como única fonte de carbono, corroborando com os resultados observados no presente estudo, onde tal co-substrato (controle 2 e condição otimizada) pode ter sido favorável ao aumento de sua abundância relativa em comparação às demais condições (controles 1).

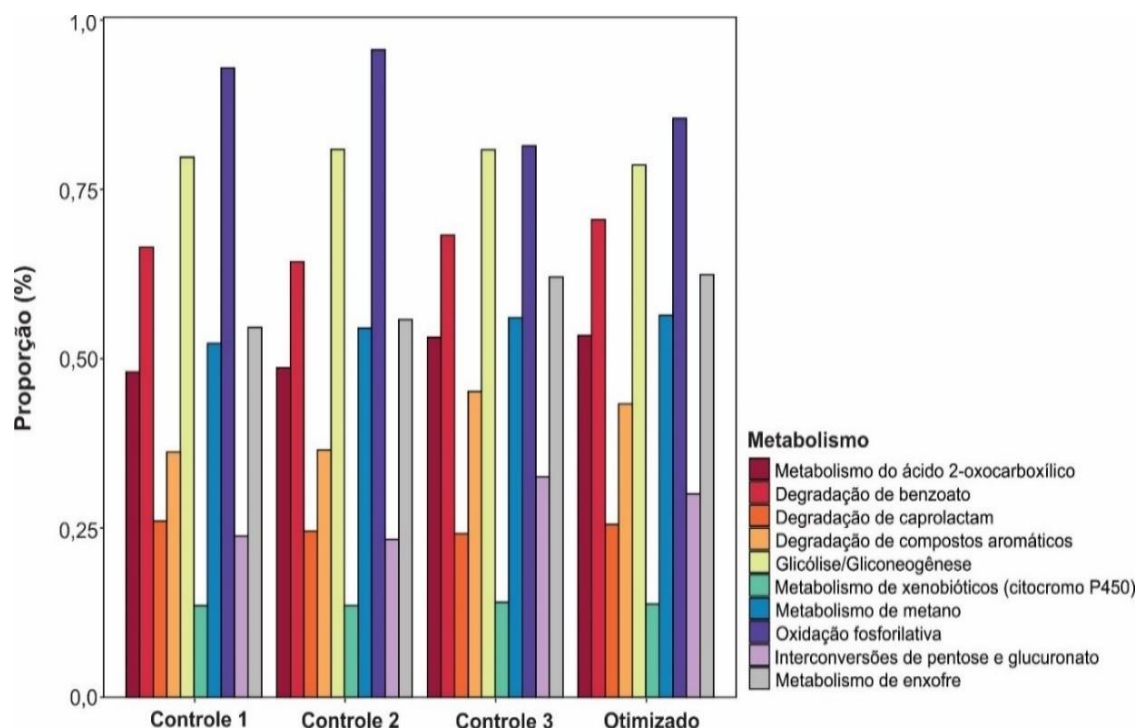
Desulfobulbus e *Desulfovibrio* (Proteobacteria) são bactérias Gram-negativas, anaeróbias aerotolerantes e redutoras de sulfato, capazes de degradar compostos aromáticos, além de realizar a dessulfonação e assimilação de nitrato como acceptor de elétrons (Brenner et al., 2005; Heidelberg et al., 2004; Motteran et al., 2018). De acordo com Zeng et al. (2019) e Ryzhmanova et al. (2019), tais gêneros podem utilizar o etanol como doador de elétrons, por meio da enzima álcool dehidrogenase, com concomitante produção de ácido acético e/ou propiônico, o que pode justificar sua maior abundância relativa no controle 2 (etanol + ibuprofeno). Sob tais condições, a concentração final de ácido acético observada foi de 73,9 mg L⁻¹ e 43,7 mg L⁻¹ de ácido propiônico.

Após a inferência dos potenciais genes codificantes de enzimas envolvidos nas diferentes condições dos ensaios de degradação de ibuprofeno foram obtidas 6.413 KO para a amostra referente ao controle 1 (ibuprofeno), 6.823 para o controle 2 (ibuprofeno + etanol), 6938 para o controle 3 (ibuprofeno + nitrato) e 6.762 para a condição otimizada (ibuprofeno + etanol+ nitrato).

Os principais níveis metabólicos possivelmente relacionados com a degradação do ibuprofeno, bem como dos co-substratos utilizados (etanol e nitrato) foram filtrados de acordo com os respectivos níveis de KEGG *Orthology* (Figura 5.22). Vale ressaltar que as maiores proporções observadas em todas as amostras se referem às vias de fosforilação oxidativa (0,81-0,96%), possivelmente devido à grande importância da β -oxidação na degradação do ibuprofeno e degradação da matéria orgânica (Delforno et al., 2019; Gonzalez-Gil et al., 2016; Granatto et al., 2020). Ainda, em relação às vias diretamente envolvidas na degradação deste composto, destaca-se aquela de degradação de compostos aromáticos (0,36-0,45%) e benzoato (0,64-0,71%), com a conversão da molécula de benzoil-CoA em acetil-CoA e/ou acetaldeído e piruvato.

Assim como, para a via de degradação de benzoato, foram observadas maiores proporções para glicólise (0,79-0,81%), via envolvida tanto na assimilação do etanol, além de vias relacionadas aos demais processos metabólicos celulares, como na produção de acetaldeído, acetil-CoA e piruvato. Vale destacar que a degradação de xenobióticos depende da produção de enzimas necessárias para sua degradação, sendo assim, a simbiose entre as diferentes populações microbianas é o que possibilita que compostos recalcitrantes sejam convertidos em subprodutos que podem ser utilizados como substrato por outros organismos.

Figura 5.22. Principais vias metabólicas envolvidas na degradação de ibuprofeno em reatores contendo etanol e nitrato. As vias foram estimadas de acordo com os KO inferidos por meio do pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6. As proporções foram calculadas de acordo com o número total de KO obtidos para cada amostra analisada.



Controle 1= ibuprofeno; controle 2= ibuprofeno + etanol; controle 3= ibuprofeno + nitrato; condição otimizada= ibuprofeno+ etanol + nitrato.

Conforme Marchlewicz et al. (2016), a degradação do ibuprofeno pode ocorrer via hidroxilação do anel aromático e da cadeia alifática através das enzimas monooxigenases alifática, fenol e hidroquinona. Esta derivatização da molécula parental pode gerar o metabólito principal 2-hidroxiibuprofeno, além do 1,4 hidroquinona, gerado pela atividade tiolase e pela síntese do acetilCoA, que em seguida é convertida em 2-hidroxi-1,4-quinol. A enzima hidroxiquinol 1,2-dioxigenase liga preferencialmente ao 2-hidroxi-1,4-quinol e promove a orto clivagem deste composto em ácido 3-hidroxi-cis.

Outra rota de transformação deste fármaco é pela via metabólica proposta por Marco-Urrea et al. (2009). Segundo os autores, a cadeia isopropílica do ibuprofeno é oxidada, produzindo o 2-hidroxi ibuprofeno e 1-hidroxi ibuprofeno como produtos da primeira etapa; e 1,2-hidroxi-ibuprofeno na segunda etapa. Em seguida, as transformações desta molécula incluem descarboxilação, quebra do anel aromático e formação da quinona. Murdoch e Hay observaram a degradação do ibuprofeno por *Sphingomonas* em condições anóxicas, cuja rota de degradação do fármaco envolve a ligação da coenzima A, seguida

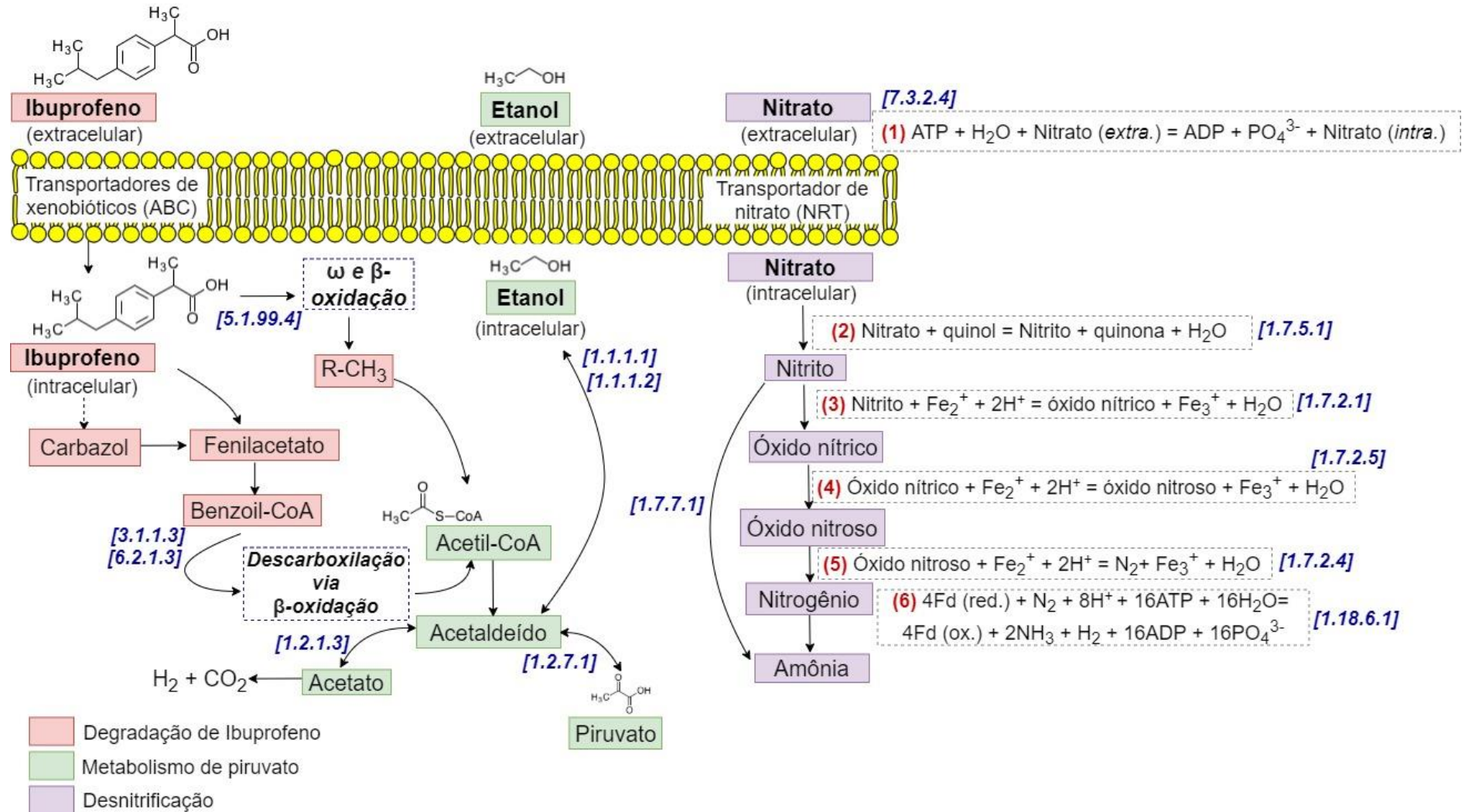
pela desacetilação e desoxigenação para a formação do isobutylcatecol, de forma concomitante a clivagem do anel aromático (Murdoch e Hay, 2013, 2005).

Os produtos de cuidado pessoal (PPCPs), em geral, contém anel aromático em sua estrutura química. Assim, os gêneros associados à degradação destes compostos são citados pela capacidade de realizar a clivagem e hidroxilação da cadeia aromática (Arias et al., 2018; Chan et al., 2009; Chang et al., 2014; Lin et al., 2010). Nesta pesquisa, os gêneros identificados foram associados à capacidade de realizar mecanismos de β -oxidação, hidroxilação, consumo de etanol e remoção de nitrato. As vias metabólicas envolvidas na degradação do ibuprofeno a partir de etanol e nitrato como co-substratos encontram-se resumidas na Figura 5.23. A degradação biológica do ibuprofeno se inicia após a ação de uma enzima transportadora de xenobióticos do tipo ABC [7.6.2.2] (Equação 5.9), usualmente produzida por bactérias Gram-positivas e também por bactérias facultativas do gênero *Pseudomonas*, cuja abundância relativa observada foi entre 1,0-1,5% em todas as condições avaliadas. De acordo com Larcher e Yargeau, (2011) *Pseudomonas* está relacionada com a degradação de micropoluentes, como por exemplo, os fármacos.

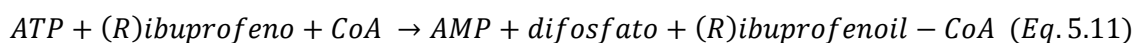
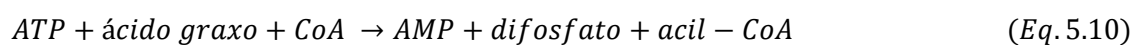


Compostos contendo mais de dez carbonos e anéis aromáticos, como o ibuprofeno ($C_{13}H_{18}O_2$) sofrem ação da α -metilacil-CoA racemase/ibuprofenoil-CoA epimerase [5.1.99.4]. Além disso, vale destacar a ação de catalases [1.11.1.6] e pseudoperoxidases [1.11.1.7] em substâncias orgânicas, com afinidade, tanto pelo ibuprofeno, quanto pelo etanol, com formação de acetaldeído.

Figura 5.23. Vias metabólicas envolvidas em reatores aplicados a degradação de ibuprofeno contendo etanol e nitrato. Os números EC apresentados entre colchetes, referentes às enzimas potencialmente envolvidas em cada reação, foram inferidos pelo pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6 e via base de dados BRENDA.



A descarboxilação dos compostos fenilacetato e benzoil-CoA pode ocorrer via β -oxidação, com formação de acetaldeído e/ou acetil-CoA (Ivshina et al., 2019), assim como a clivagem dos anéis aromáticos do ibuprofeno (Ghattas et al., 2017; Granatto et al., 2020). Vale ressaltar que a adição da coenzima A ao longo do processo de degradação do ibuprofeno ocorre via oxidação de um octano, como no fenilacetato ($C_8H_8O_2$), por meio da ação de uma CoA-ligase de ácidos graxos de cadeia longa [6.2.1.3] (Equações 5.10 e 5.11). Vale enfatizar que tal processo pode ocorrer, tanto em condições anóxicas (controle 3 e condição otimizada), quanto facultativas (controles 1 e 2), sendo então *Pseudomonas* o principal gênero relacionado a tal etapa (Kang et al., 2010).



Assim como, evidenciado via ensaios de DCCR, o co-substrato etanol é de grande importância para o processo, uma vez que, gêneros como *Desulfovibrio* e *Desulfobulbus* podem utilizar este composto como doadores de elétrons, suprindo ATP no sistema e favorecendo a degradação de xenobióticos recalcitrantes, como o ibuprofeno (Delforno et al., 2019; Gonzalez-Gil et al., 2016; Granatto et al., 2020). Além disso, foi possível evidenciar a via completa de desnitrificação por meio da predição dos potenciais genes envolvidos neste processo no KO, como o transportador de nitrato tipo ABC [7.3.2.4], nitrato redutase (quinona) [1.7.5.1], nitrito redutase [1.7.2.1], óxido nítrico redutase [1.7.2.5], óxido nitroso redutase [1.7.2.4] e nitrogenase [1.18.6.1].

Dechloromonas, identificada em abundância relativa $\geq 1\%$ em todas as amostras analisadas, também está relacionada com a degradação de anti-inflamatórios e antibióticos acoplada a remoção de nitrato (He et al., 2021). Segundo Chakraborty et al. (2005), representantes deste gênero degradam compostos cloro-benzenos em condições anóxicas via de cloração redutiva. Xia et al. (2012) identificaram *Dechloromonas* em inóculo proveniente de sistema anóxico de degradação de antibióticos.

Rhodanobacter tem sido identificado em sistemas de lodos ativados, realizam a desnitrificação e degradação de compostos aromáticos de alto peso molecular, tais como compostos policíclicos aromáticos (HPA) (SONG et al., 2016), surfactantes aniônicos (Zhang et al. 2010; Okada et al., 2013; Braga et al., 2015), fenóis, tolueno e benzoato (Brenner et al., 2005; Salinero et al., 2009; Vos et al., 2009; Krieg et al., 2010), incluindo também os ácidos orgânicos voláteis (Yoshikawa et al., 2017), fármacos anti-inflamatórios

e não-esteroidais como diclofenaco e ibuprofeno (Navrozidou et al, 2019). Neste trabalho, tal gênero foi identificado em todas as condições, com maior abundância relativa no reator controle 1, contendo apenas ibuprofeno.

As vias metabólicas preditas e relacionadas à degradação do ibuprofeno, tanto individualmente, quanto em cometabolismo com etanol e nitrato, bem como os microrganismos relacionados a tais vias, são de grande relevância para o subsídio de trabalhos futuros acerca da remoção de ibuprofeno e demais fármaco, além dos compostos recalcitrantes, seja para seleção inicial do inóculo ou ainda para monitoramento do processo de degradação.

5.4 Operação do reator de leito fluidificado

5.4.1. Inoculação

O inóculo proveniente de lodo aeróbio de sistemas de lodos ativados usado no tratamento de esgoto sanitário foi composto por 15,0 g L⁻¹ de sólidos totais voláteis (Tabela 5.16). O pH e alcalinidade total do lodo, à temperatura de 21±1°C, foram de 7,9 e 870,1 mgCaCO₃ L⁻¹, respectivamente.

Tabela 5.16 Valores da série de sólidos totais do inóculo

Biomassa	g L⁻¹
Sólidos totais – ST	17,2 ± 0,4
Sólidos Totais Voláteis – STV	15,0 ± 0,4
Sólidos Totais Fixos – STF	2,1 ± 0,1

Fonte: a autora

A fase de inoculação teve duração de 30 dias, mantido em circuito fechado com o intuito de imobilização da biomassa no material suporte. Nesta etapa, foi realizado o monitoramento da matéria orgânica (Figura 5.24) e do nitrato (Figura 5.25). A suplementação de nitrato, etanol e esgoto sanitário no sistema foi feita em função da remoção completa do nitrato. Este procedimento foi realizado com a finalidade de selecionar populações de bactérias desnitrificantes. Dessa forma, foram adicionados aproximadamente 20L de esgoto sanitário da ETE Monjolinho equivalente a 15% do volume no reator, além de 150 mg L⁻¹ de nitrato e 100 mg L⁻¹ de etanol.

Figura 5.24. Variação temporal da remoção da matéria orgânica durante a inoculação do RLF

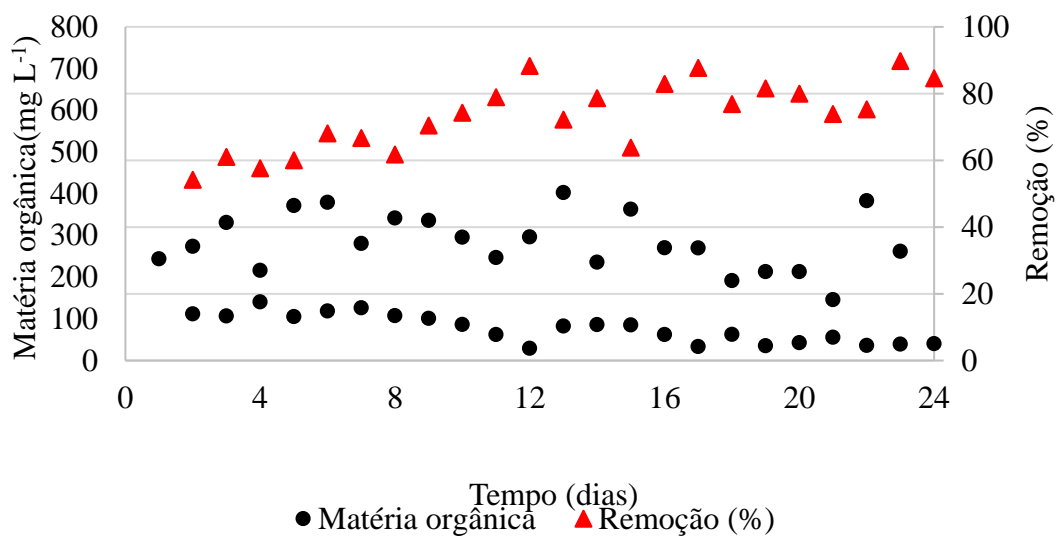
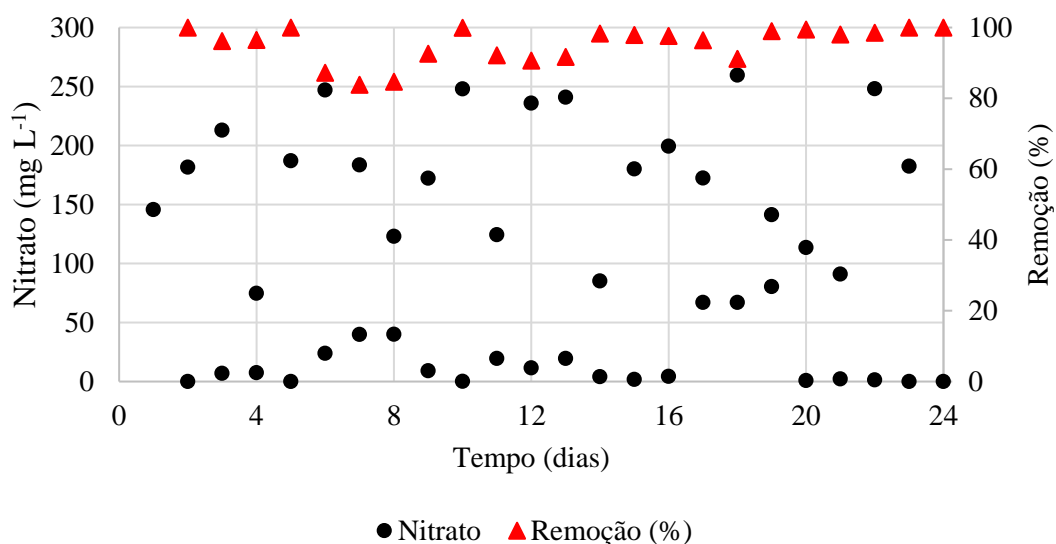


Figura 5.25. Variação temporal da remoção de nitrato durante a inoculação do RLF



Em relação ao pH, observou-se $8,4 \pm 0,2$ com variação entre 7,8 a 8,8 durante o período de inoculação do RLF (Figura 5.26). Durante essa fase, notou-se o aumento do pH e da alcalinidade (Figura 5.27) em relação ao esgoto sanitário (pH $7,0 \pm 1,0$). Provavelmente, isso pode ter ocorrido em função do metabolismo desnitrificante na qual ocorre a conversão do nitrato em nitrogênio gasoso e bicarbonato (GAVAZZA DOS SANTOS et al., 2004; MUNZ et al., 2019).

Figura 5.26. Variação temporal dos valores de pH durante a inoculação do RLF

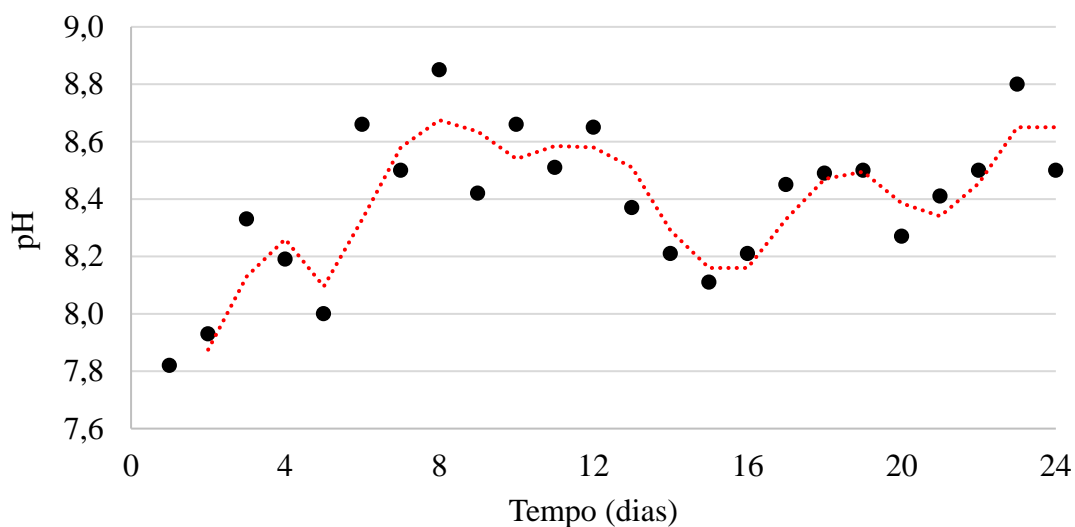
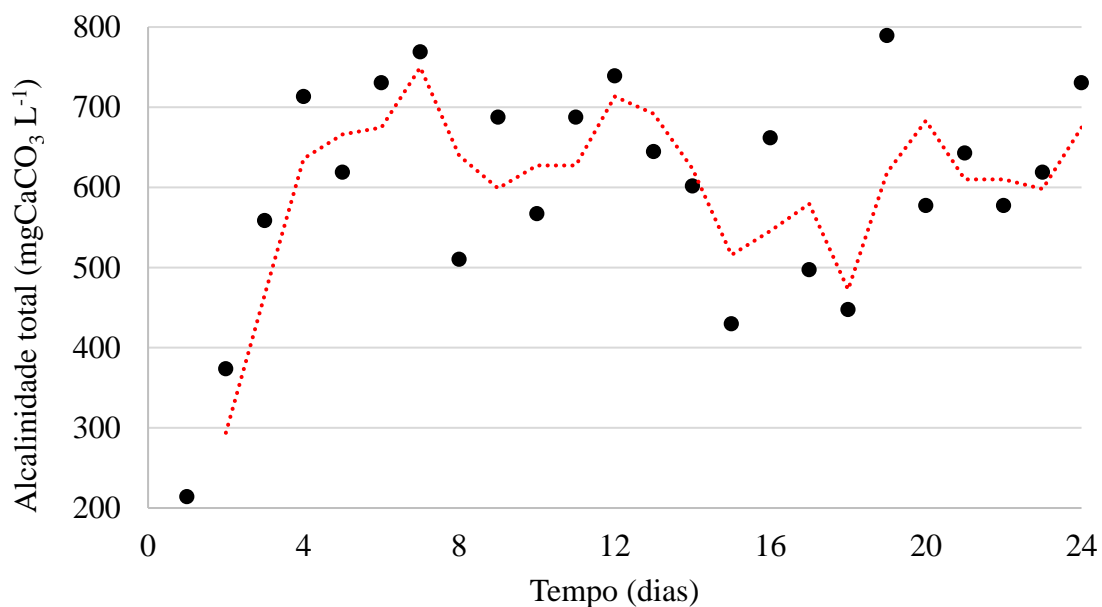


Figura 5.27. Variação temporal dos valores de alcalinidade total durante a inoculação do RLF



5.4.2. Monitoramento do RLF

Após a etapa de inoculação, iniciou-se a operação do RLF em circuito aberto, cuja duração das fases foi determinada pela estabilidade da remoção de matéria orgânica (DQO) e dos fármacos (DCF e IBU). Os parâmetros físico-químicos de monitoramento do reator (Tabela 5.17), bem como a caracterização microbiana do inóculo e ao final das fases I, III e IV serão abordados neste item.

Tabela 5.17. Parâmetros operacionais do RLF

Parâmetros	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Duração (d)	48	70	70	70
TDH (h)	18 ± 3	18 ± 2	12 ± 1	18 ± 2
DQO				
Afluente (mg L ⁻¹)	310 ± 54	364 ± 70	360 ± 49	438 ± 74
Efluente (mg L ⁻¹)	122 ± 37	182 ± 48	224 ± 37	201 ± 47
Eficiência (%)	60,0 ± 11,6	51,0 ± 10,5	37,0 ± 8,8	56,3 ± 7,9
Nitrato (NO ₃ ⁻)				
Afluente (mg L ⁻¹)	136 ± 59	89 ± 14	100 ± 10	13 ± 2
Efluente (mg L ⁻¹)	3 ± 2	6 ± 4	6 ± 1	9 ± 1
Eficiência (%)	97,2 ± 3,7	93,4 ± 6,5	93,2 ± 2,6	32,6 ± 16,2
DQO/Nitrato	2,28	4,09	3,60	33,69
Etanol (EtOH)				
Afluente (mg L ⁻¹)	74,7 ± 35,5	91,4 ± 30,9	100 ± 18,2	89,7 ± 39,2
Efluente (mg L ⁻¹)	5,6 ± 0,5	5,6 ± 0,5	24,7 ± 18	1,3 ± 3,0
Eficiência (%)	92,9 ± 1,4	92,3 ± 8,0	70,5 ± 2,3	99,7 ± 1,2
DCF				
Afluente (µg L ⁻¹)	-	120,0 ± 25	90,1 ± 36	185,6 ± 29,9
Efluente (µg L ⁻¹)	-	94,4 ± 18,1	57 ± 19,7	81,7 ± 28,1
Eficiência (%)	-	27,6 ± 12	35,2 ± 19	52,9 ± 11,4
IBU				
Afluente (µg L ⁻¹)	-	167,7 ± 35	148,9 ± 33	150 ± 44,4
Efluente (µg L ⁻¹)	-	123 ± 41	79,4 ± 33	66,4 ± 14,3
Eficiência (%)	-	30,3 ± 22	39,6 ± 2,4	55,8 ± 11,4
LAS				
Afluente (mg L ⁻¹)	1,4 ± 0,9	4,5 ± 2,9	2,6 ± 1,6	3,5 ± 0,9
Efluente (mg L ⁻¹)	2,0 ± 1,2	1,8 ± 1,7	1,5 ± 1,3	1,8 ± 0,9
Eficiência (%)	-	56,5 ± 24,7	53,0 ± 7,3	63,3 ± 18,7
Alcalinidade afluente				
Total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	196 ± 29	316 ± 70	279 ± 52	214 ± 30
PA (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	166 ± 42	249 ± 49	214 ± 44	158 ± 23
IA (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	41 ± 12	72 ± 28	69 ± 16	53 ± 13
IA/IP	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
pH	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,2	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1
Alcalinidade efluente				
Total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	279 ± 70	311 ± 85	312 ± 78	250 ± 40
PA (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	209 ± 56	238 ± 63	249 ± 44	192 ± 34
IA (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	66 ± 20	86 ± 23	78 ± 21	56 ± 22
IA/IP	0,34 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
pH	7,89 ± 0,1	7,6 ± 0,2	7,7 ± 0,1	7,4 ± 0,2
AOV				
Afluente (mgHAc L ⁻¹)	89 ± 34	145 ± 56	138 ± 33	106 ± 27
Efluente (mgHAc L ⁻¹)	142 ± 47	195 ± 50	155 ± 41	226 ± 23

TDH: tempo de detenção hidráulica; DQO: demanda química de oxigênio. DQO/NO₃⁻: Relação demanda química de oxigênio e nitrato; DCF: Diclofenaco; IBU: Ibuprofeno; LAS: linear alquilbenzeno sulfonado. AP: Alcalinidade Parcial; AI: Alcalinidade Intermediária; AOV: Ácidos orgânicos Voláteis; Valores das médias obtidas em réplicas de triplicatas, ±: desvio padrão das triplicatas de amostras.

5.4.2.1 Remoção da matéria orgânica

O RLF foi monitorado durante 258 dias com matéria orgânica afluyente de $378,1 \pm 78,1$ mg DQO L⁻¹, para todas as fases de operação (Tabela 5.18). O metabolismo predominante na Fase I foi a redução desassimilativa de nitrato via desnitrificação heterotrófica, já que a remoção de nitrato e matéria orgânica foram de $97,2 \pm 3,7\%$ e $60,0 \pm 11,6\%$, respectivamente.

Na fase I, a alimentação do reator foi referente ao esgoto sanitário suplementado com $74,7 \pm 35,5$ mg L⁻¹ de etanol, 136 ± 59 mg L⁻¹ de nitrato, e 310 ± 54 mg DQO L⁻¹ afluyente. Nas demais fases, a matéria orgânica afluyente foi de 364 ± 70 mg DQO L⁻¹ na fase II (TDH = 18 ± 2 h), 360 ± 49 mg DQO L⁻¹ na fase III (TDH = 12 ± 1 h) e 438 ± 74 mg DQO L⁻¹ na fase IV (TDH = 18 ± 2 h). A adição dos fármacos, em $\mu\text{g L}^{-1}$, não interferiu significativamente em maior concentração de matéria orgânica afluyente, uma vez que suas contribuições teóricas equivalem a fração em $\mu\text{g L}^{-1}$.

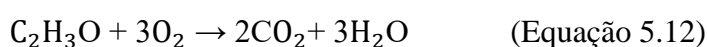
Em relação a matéria orgânica efluyente (Tabela 5.19 e Figuras 5.28 a 5.30) foi observada 122 ± 37 mg DQO L⁻¹ na fase I, 182 ± 48 mg DQO L⁻¹ na Fase II, 224 ± 37 mg DQO L⁻¹ na Fase III e 201 ± 47 mg DQO L⁻¹ na Fase IV. Pelo teste de Tukey, houve variação significativa das médias entre as fases: fase I com Fase II e essa com a fase III; além das Fases III com a II. Tais etapas operacionais diferenciaram-se principalmente em função do TDH (12 horas para a fase III e 18 horas para a fase IV) e pela presença dos fármacos; ou seja, fase I, sem adição do DCF e IBU; enquanto na Fase II com DCF e IBU na alimentação do RLF.

Tabela 5.18. Valores de matéria orgânica afluyente e efluyente do RLF

Fases operacionais	Matéria Orgânica	Matéria Orgânica	Remoção (%)
	afluyente (mg DQO L ⁻¹)	efluyente (mg DQO L ⁻¹)	
Fase I	$310,9 \pm 53,75$	$122,86 \pm 36,70$	$60,02 \pm 11,58$
Fase II	$364,56 \pm 70,07$	$181,68 \pm 48,08$	$51,08 \pm 10,49$
Fase III	$360,18 \pm 49,15$	$223,99 \pm 36,77$	$37,03 \pm 8,85$
Fase IV	$438,76 \pm 74,02$	$201,73 \pm 46,86$	$56,36 \pm 7,95$

O etanol foi o principal doador de elétrons para sustentar a desnitrificação. Isto pode ser constatado levando-se em consideração a DQO teórica do etanol, de $2,09$ mg L⁻¹, dada

pela estequiometria da reação de oxidação (Equação 5.12). Assim, a DQO afluente da Fase I, referente a $74,7 \pm 35,5 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol, foi de $156 \text{ mg DQO L}^{-1}$ e representou 50% da DQO total ($310 \pm 54 \text{ mg L}^{-1}$). Já no efluente foram verificados $5,6 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol, que corresponderam a $11,6 \text{ mg DQO L}^{-1}$ e representaram 9,6% da DQO total efluente ($122 \pm 37 \text{ mg L}^{-1}$). A variação do percentual de etanol (em DQO equivalente) de 50% (afluente) para 9,6% (efluente) reforçam que este substrato foi doador de elétrons preferencial para a desnitrificação. Ainda, a alta eficiência de remoção de nitrato associada a ocorrência de DQO residual efluente ($122 \pm 37 \text{ mg L}^{-1}$), significam que o nitrato foi limitante para a remoção da matéria orgânica, sendo valor inferior conforme a estequiometria.



O estabelecimento da desnitrificação heterotrófica na Fase I também é constatado pela variação da alcalinidade total, sendo de $196 \pm 29 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ no afluente e $279 \pm 70 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ no efluente, e pH de 7,3 para 7,9, respectivamente. Provavelmente, a maior alcalinidade efluente está relacionada a desnitrificação heterotrófica, na qual ocorre a conversão do nitrato em nitrogênio gasoso e bicarbonato (Equação 5.13) (GAVAZZA DOS SANTOS et al., 2004; MUNZ et al., 2019). Em termos estequiométricos, para 1,0 mg de nitrato reduzido a N_2 , são produzidos 3,6 mg de bicarbonato. Isto resulta no aumento do pH, conforme verificado neste estudo.



Na Fase II nenhuma alteração significativa foi observada na remoção de matéria orgânica ($51,0 \pm 10,5\%$) e nitrato ($93,4 \pm 6,5\%$) com DCF ($120,0 \pm 25 \mu\text{g L}^{-1}$) e IBU ($167,7 \pm 35 \mu\text{g L}^{-1}$). Nesta fase, a desnitrificação heterotrófica também foi predominante e similar a fase anterior. Sob tais condições foi verificado inferior remoção de DCF e IBU em comparação com a Fase III e IV; ou seja, de $27,6 \pm 12\%$ e $30,3 \pm 22\%$, respectivamente. Provavelmente, o etanol ($92,3 \pm 8,0\%$), um substrato de fácil metabolização como doador de elétrons na respiração anóxica foi usado, em detrimento aos fármacos (CONTRERAS et al., 2019). Na Fase III para TDH de $12 \pm 1 \text{ h}$ foi observada diminuição da eficiência de remoção de matéria orgânica para $37,0 \pm 8,8\%$, a qual foi significativamente inferior as Fases I ($60,0 \pm 11,6$) e Fase II ($51 \pm 10,5$).

Figura 5.28. Valores de matéria orgânica nas fases diferentes fases operacionais do RLF.

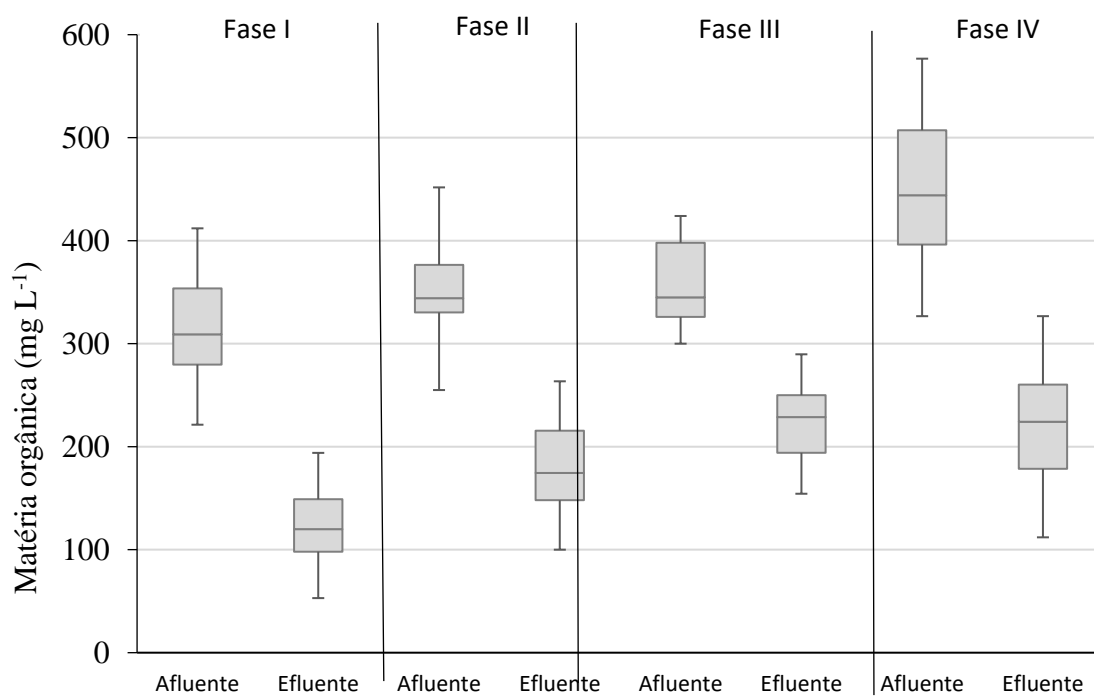


Figura 5.29. Valores de remoção de matéria orgânica durante as diferentes fases operacionais do RLF.

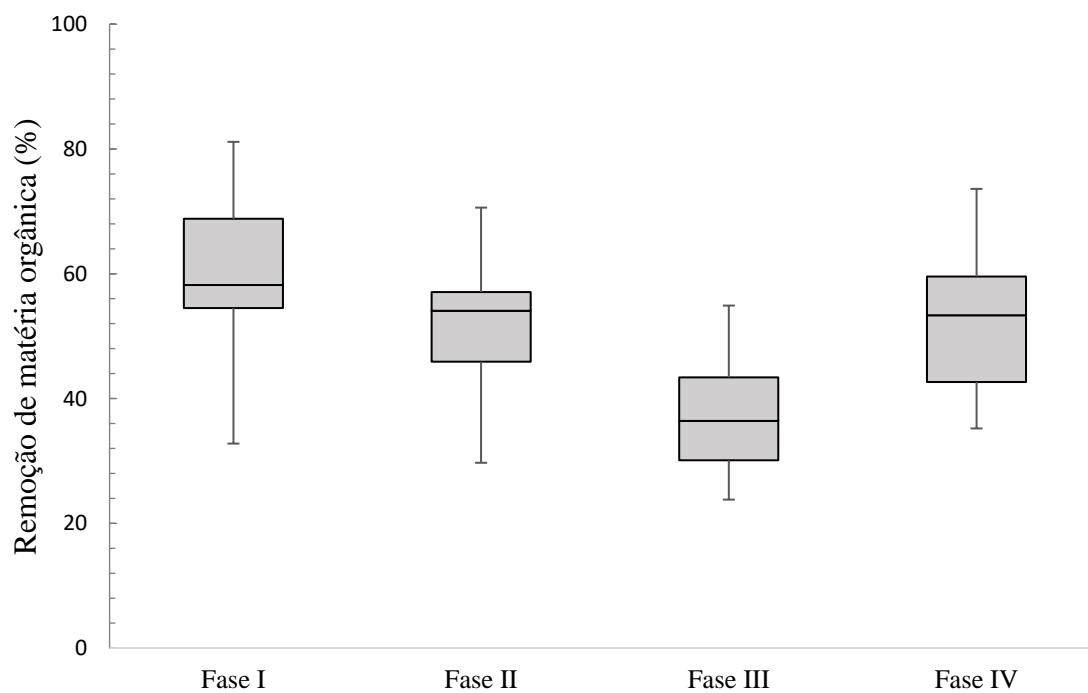
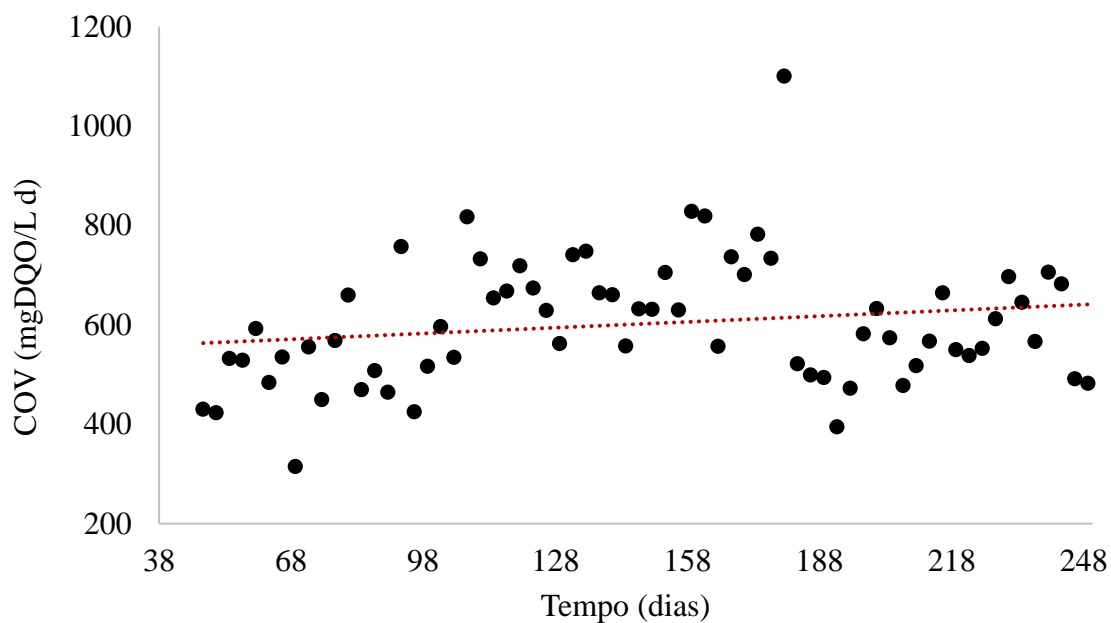


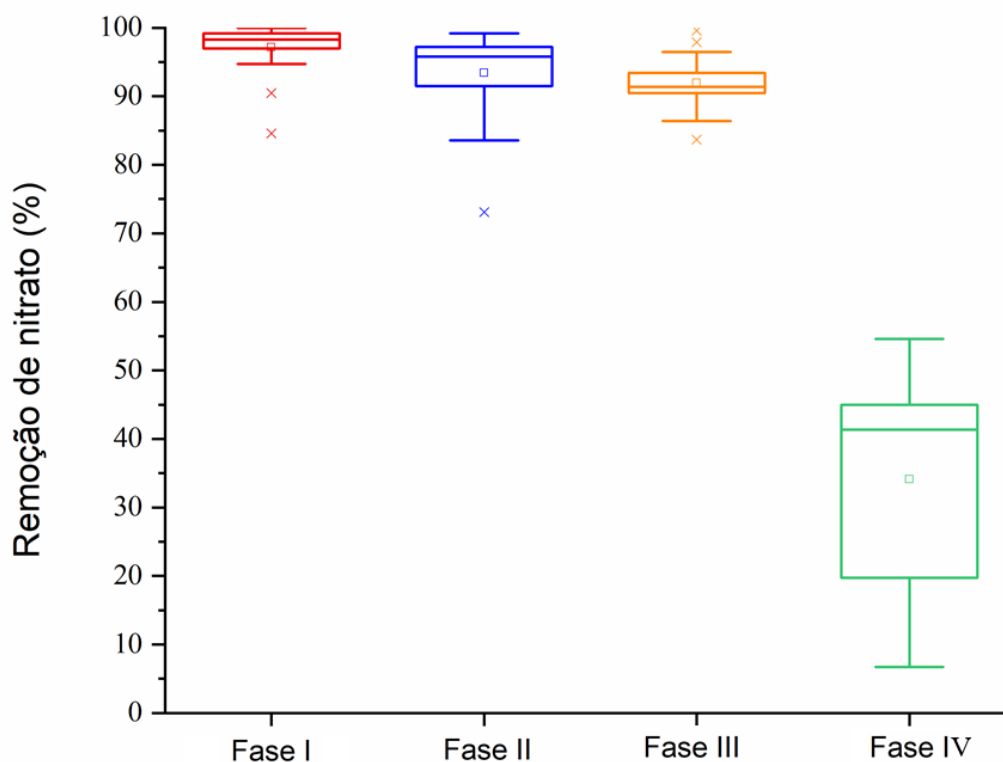
Figura 5.30. Carga orgânica volumétrica nas fases I, II, III e IV de operação do RLF

5.4.2.2 Remoção de nitrato

Nas fases II e III, a eficiência de remoção do nitrato foi em média de $93,4 \pm 6,5\%$ e $97,2 \pm 3,7\%$ a partir de concentrações afluentes de $89 \pm 14 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $100 \pm 10 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.31). A remoção de nitrato na fase I foi de $97,2 \pm 3,7\%$ a partir de $136 \pm 59 \text{ mgNO}_3^- \text{ L}^{-1}$ afluente. Sob tais condições, a adição do diclofenaco e ibuprofeno não interferiu na eficiência de remoção do nitrato.

Em estudos anteriores com menor TDH, Arias et al., (2018) obtiveram remoção de 5% e 40% para diclofenaco ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) e ibuprofeno ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) sem co-substrato orgânico afluente ao reator UASB seguido de lodos ativados (tanque de nitrificação e desnitrificação) em escala aumentada com TDH de 9 horas. Sob tais condições, a desnitrificação foi favorecida em menor TDH.

Figura 5.31. Eficiência de remoção de nitrato nas fases operacionais do RLF



Na Fase IV em TDH de 18 ± 2 h, a concentração de nitrato afluyente era de 13 ± 2 mg L⁻¹ e proveniente do esgoto sanitário, resultando em relação de matéria orgânica e nitrato (DQO/NO₃⁻) de 33,7, muito superior àquela aplicada na Fase I (DQO/NO₃⁻ 2,28), Fase II (DQO/NO₃⁻ 4,09) e Fase III (DQO/NO₃⁻ 3,60). Nesta condição da Fase IV propiciou remoção inferior de nitrato de $32,6 \pm 16,2\%$, conseqüentemente o nitrato não foi o aceptor de elétrons preferencial. Pelaz et al. (2018) verificaram aumento da eficiência de remoção de nitrato (87,1%) para relação DQO/NO₃⁻ (8,25) e inferior ao presente estudo (33,7). Provavelmente, a concentração de nitrato afluyente (13 ± 2 mg L⁻¹) foi insuficiente para sustentar a desnitrificação como rota preferencial, o que pode ser relacionado ao desequilíbrio do sistema e favorecimento de populações acidogênicas em função da ausência do nitrato como principal aceptor de elétrons da respiração anóxica.

O provável motivo para a máxima remoção de nitrato na Fase I foi a configuração do RLF, Patroescu et al. (2019) compararam o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes com base na remoção de nitrato em leito fixo com o fluidizado. Os autores obtiveram taxas de desnitrificação 2,5 vezes maior em leito fluidizado do que obtido em biorreatores de leito fixo, o qual pode estar relacionado com a maior transferência de substrato causada pela recirculação e movimento do leito. Dessa forma, corroborando com

o presente estudo, pode-se inferir que a condição fluidizada contribuiu para a adaptação da desnitrificação via remoção do nitrato e possivelmente para a maturação do biofilme na presença do diclofenaco e ibuprofeno nas Fases operacionais.

Semelhante à concentração de nitrato aplicada no presente estudo ($90 - 100 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$), Arias et al (2018) obtiveram remoção acima de 80% de nitrato em todas as fases de operação do sistema contínuo. Estes autores usaram outra configuração de reator correspondente à conjugação de Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (UASB) (120 L) ao sistema de lodos ativados – tanque de nitrificação e desnitrificação (56 L), alimentado por esgoto sintético e suplementado com 80 mg N L^{-1} em TDH de 20 h. Segundo os autores, a desnitrificação e a remoção de matéria orgânica ocorreram graças ao consórcio entre microrganismos desnitrificantes heterotróficos.

Torresi et al. (2017) usaram composto recalcitrante com estrutura molecular semelhante ao diclofenaco e obtiveram 80% de eficiência de remoção de nitrato (70 mg L^{-1}) em biofilmes anóxicos de leito móvel em TDH de 2 horas, alimentado com esgoto doméstico suplementado com carbamazepina ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e 40 mg L^{-1} de metanol como co-substrato. Os autores observaram que a carbamazepina como composto recalcitrante não interferiu na desnitrificação. Tais condições podem ser corroboradas com o presente estudo, uma vez que a carbamazepina tem grupamento amina além das cadeias aromáticas, semelhante à composição do diclofenaco. Dessa forma, a remoção de nitrato no presente estudo foi superior a 93% tendo como principal doador de elétrons o etanol. A diminuição do TDH de $18 \pm 2\text{h}$ para $12 \pm 1\text{h}$ não influenciou na desnitrificação.

5.4.2.3 *Remoção de diclofenaco, ibuprofeno e balanço de massa*

Pelo teste de Tukey foi observada variação significativa da concentração média afluyente de diclofenaco na Fase III em comparação com as demais. Menor concentração de diclofenaco (42 ± 10 a $120 \pm 15,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foi observada em 50% das amostras afluentes na fase II, enquanto maior concentração foi obtida nas amostras de fase II e IV ($100 \pm 25,6$ a $140 \pm 30 \mu\text{g L}^{-1}$). Quanto ao ibuprofeno, maiores concentrações afluentes (230 ± 23 a $250 \pm 35 \mu\text{g L}^{-1}$) foram detectadas em 30% das amostras nas fases II e IV, enquanto menores concentrações ($46,30$ a $113,59 \mu\text{g L}^{-1}$) foram observadas em 10% das amostras na fase II.

Conforme o balanço de massa no sistema, a massa total adicionada na Fase III foi de 1.587,6 mg para o DCF e 2.626,9 mg para o IBU, enquanto a massa total no efluente foi de 1.005,5 mg e 1.400,6 mg, respectivamente (Tabela 5.19). Com base no valor adsorvido em miligramas de areia e a massa total de areia do leito de 26.780 g, a massa total adsorvida ao final da operação foi de 19,3 mg (DCF) e 11,8 mg (IBU) na Fase III e 14,3 (DCF) e 9,4 (IBU) na Fase IV. Assim, a massa biodegradada de DCF foi de 562,8 mg (Fase III) e 1228,1 mg (Fase IV), que corresponderam a 35,5% e 55,7%, respectivamente. Em relação ao IBU, a massa total biodegradada na Fase III foi de 1.214,2 mg e de 983,6 mg na Fase IV, que corresponderam a 46,2% e 55,2%, respectivamente. Deste modo, pode-se verificar que a principal via de remoção foi a degradação, já que o percentual adsorvido na Fase III foi de 1,2% (DCF) e 0,4% (IBU) e na Fase IV de 0,6% (DCF) e 0,5% (IBU).

Tabela 5.19. Balanço de massa de Diclofenaco e Ibuprofeno em massa total e percentual.

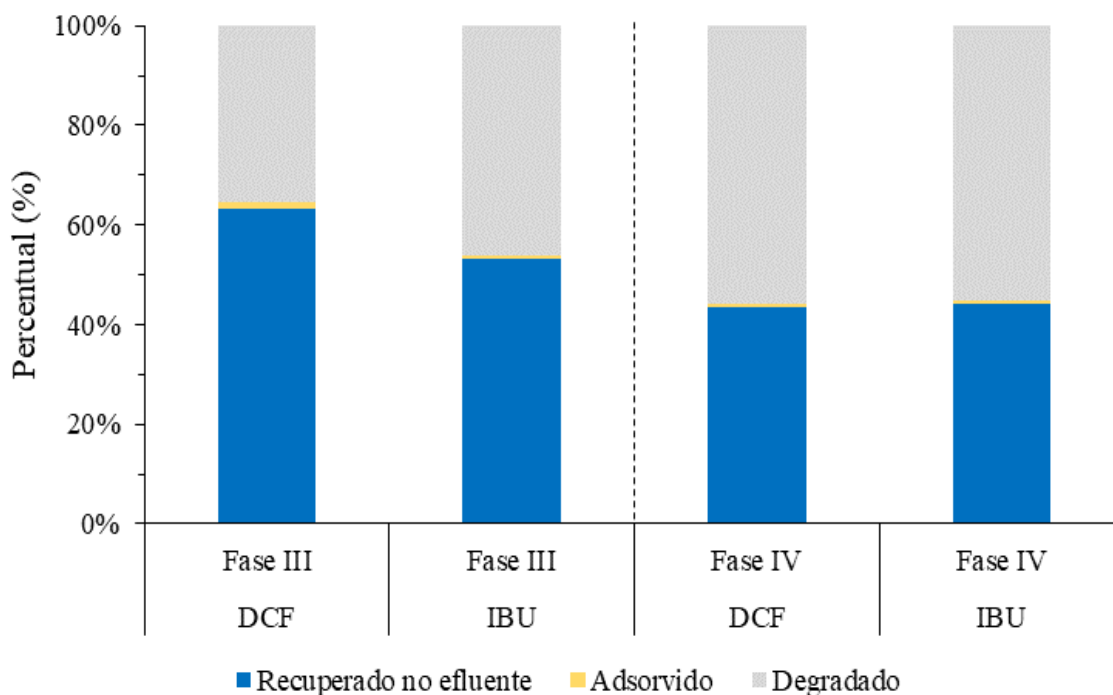
		Massa total (mg L ⁻¹)				Percentual (%)		
		Afluente	Efluente	Adsorvido	Degradado	Efluente	Adsorvido	Degradado
Fase III	DCF	1587,6	1005,5	19,3	562,8	63,3	1,2	35,5
	IBU	2626,6	1400,6	11,8	1214,2	53,3	0,4	46,2
Fase IV	DCF	2204,483	962,1	14,3	1228,1	43,6	0,6	55,7
	IBU	1781,8	788,7	9,4	983,6	44,3	0,5	55,2

Granatto et al. (2021) relataram valores de adsorção maiores do que o presente estudo, sendo 23% de diclofenaco ($106 \pm 32 \mu\text{g L}^{-1}$ afluente) e 15% de ibuprofeno ($166 \pm 55 \mu\text{g L}^{-1}$ afluente) em reator EGSB (HRT= 20h) alimentado com esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos-SP (Brasil) semelhante à alimentação do RLF. Provavelmente, a maior adsorção relatada pelos autores ocorreu devido as características do reator utilizado pelos autores, que é constituído por leito com biomassa auto imobilizada em grânulos constituídos por bactérias anaeróbias e arqueias metanogênicas. Enquanto no presente estudo, a comunidade microbiana se estabelece na forma de biofilme aderido à areia utilizada como material suporte.

De acordo com os valores percentuais dos fármacos, pode-se verificar que houve aumento da degradação em ambos compostos na Fase IV, de 35,5% para 55,7% para o DCF e 46,2% para 55,2% para o IBU (Figura 5.32). Conforme discutido anteriormente, a Fase III se caracterizou por predomínio do metabolismo desnitrificante, como etanol como principal doador de elétrons, enquanto na Fase IV houve predomínio da acidogênese, pela

ausência de nitrato suficiente para a desnitrificação. Desta forma, o aumento no percentual de DCF e IBU na Fase IV pode estar relacionada ao metabolismo acidogênico.

Figura 5.32. Distribuição percentual de diclofenaco e ibuprofeno recuperado no efluente, adsorvido e degradado nas fases operacionais III e IV.



Na fase IV, sem nitrato observou-se maior eficiência de remoção dos fármacos, sendo $52,97 \pm 11,4\%$ para o diclofenaco e $55,86 \pm 11,01\%$ para ibuprofeno (Figuras 5.32 e 5.33). O provável motivo pode estar relacionado com a indução da acidogênese e produção de ácidos orgânicos nesta Fase. Além disso, a ausência de nitrato pode ter levado a competição por aceptor de elétrons e maior degradação do ibuprofeno.

Portanto, a diminuição do TDH de $18 \pm 2\text{h}$ para $12 \pm 1\text{h}$ causou redução da eficiência do consumo de etanol e da remoção de matéria orgânica. Na ausência do nitrato, metabolismo predominantemente acidogênico foi observado um aumento da variedade e concentração de ácidos orgânicos voláteis efluente. Essa mudança no perfil metabólico levou à maior eficiência de remoção de DCF ($52,9 \pm 11,4\%$), IBU ($55,8 \pm 11,4\%$), etanol ($99,7 \pm 1,2\%$).

5.4.2.4 Remoção de LAS

Em relação ao LAS, verificou-se concentração afluente de $1,47 \pm 0,96 \text{ mg L}^{-1}$; $4,52 \pm 2,99 \text{ mg L}^{-1}$; $2,65 \pm 1,66 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,51 \pm 0,96 \text{ mg L}^{-1}$ para as Fases I, II, III e IV, respectivamente (Tabela 5.20). A concentração efluente foi de $2,0 \pm 1,21 \text{ mg L}^{-1}$; $1,87 \pm 1,70 \text{ mg L}^{-1}$; $1,53 \pm 1,36 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,85 \pm 0,95 \text{ mg L}^{-1}$ para as Fases I, II, III e IV, respectivamente. Em todas as demais fases a eficiência de remoção do LAS foi superior a 50%, com exceção apenas da Fase I.

O LAS é o surfactante mais utilizado no mundo (DANEKAR; DIXIT; PRASAD, 2020) e é ubíquo ao esgoto sanitário. Devido as a característica de redução da tensão superficial, os surfactantes aumentam a solubilidade dos compostos do meio e podem levar ao favorecimento da degradação dos compostos alvo (ARYAL; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2013; HUSSEIN; ISMAIL, 2013; IGLESIAS; SANROMÁN; PAZOS, 2014).

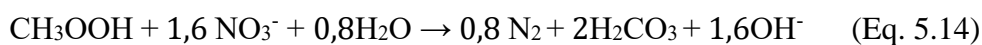
Tabela 5.20 Valores de LAS afluente e efluente do RLF.

Fases operacionais	LAS afluente (mg L⁻¹)	LAS efluente (mg L⁻¹)	Remoção (%)
Fase I	$1,47 \pm 0,96$	$2,00 \pm 1,21$	-
Fase II	$4,52 \pm 2,99$	$1,87 \pm 1,70$	$56,46 \pm 24,72$
Fase III	$2,65 \pm 1,66$	$1,53 \pm 1,36$	$53,04 \pm 37,29$
Fase IV	$3,51 \pm 0,96$	$1,85 \pm 0,95$	$63,35 \pm 18,73$

5.4.2.5 pH e alcalinidade

Em relação ao pH afluente e efluente observou-se valores de 6,7 e entre 7,2 a 8,1, respectivamente. A alcalinidade total efluente ($305,6 \pm 11,5 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) foi superior aquela observada para o afluente ($200,5 \pm 15,6 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$). Este aumento da alcalinidade pode estar relacionado ao metabolismo das bactérias desnitrificantes, via desnitrificação heterotrófica, na qual ocorre a conversão do nitrato em bicarbonato (Equação 5.14) (GAVAZZA DOS SANTOS et al., 2004; MUNZ et al., 2019). Em termos estequiométricos, para 1,0 mg de nitrato reduzido a N₂, são produzidos 3,6 mg de alcalinidade em CaCO₃, resultando no aumento do pH. Ademais, a recirculação do efluente,

principal característica operacional do reator de leito fluidificado, proporciona o aumento da alcalinidade, também reportado por Dornelles et al. (2020) e Motteran et al. (2018).



Os valores de pH afluente e efluente foram próximos à neutralidade em todas as fases operacionais (Figura 5.33), e a relação Alcalinidade Intermediária/Alcalinidade Parcial (AI/AP) próxima a 0,3, a qual é favorável ao desenvolvimento de microrganismos anaeróbios e desnitrificantes (Ripley et al., 2014). Em relação à alcalinidade total afluente, os dados foram aceitos conforme a hipótese nula de normalidade. Pelo teste de Tukey, observou-se variação significativa apenas para a média da alcalinidade na fase IV em comparação às Fases II e III. A adição de hidróxido de cálcio como alcalinizante no esgoto sanitário também pode ter contribuído para os valores de pH e alcalinidade do afluente no tratamento preliminar. Na caracterização do esgoto sanitário da ETE de São Carlos, Granatto et al. (2019) relataram valores de pH de $7,2 \pm 0,1$ e alcalinidade total de 216 ± 22 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, semelhantes ao presente estudo.

Os valores médios da alcalinidade parcial, total e intermediária, tanto do afluente como efluente estão elucidados na Tabela 5.21. Na fase II, em TDH de 12h na presença de nitrato, verificou-se maiores valores de alcalinidade afluente e efluente. Provavelmente, isso ocorreu em função da desnitrificação e também da fermentação do etanol em ácidos orgânicos voláteis, especificamente, em ácido acético, como observado em maior concentração nesta fase II.

Andrade et al. (2017) avaliaram a remoção de surfactante aniônico (LAS) em reator de leito fluidificado (TDH = 12h) sob condições desnitrificantes. Os autores também verificaram discreta redução da alcalinidade na etapa sem nitrato e com 100 mg L^{-1} de etanol. Tal observação pode ser corroborada neste estudo para a fase IV.

Figura 5.33. Variação temporal dos valores de pH durante as fases de operação do RLF

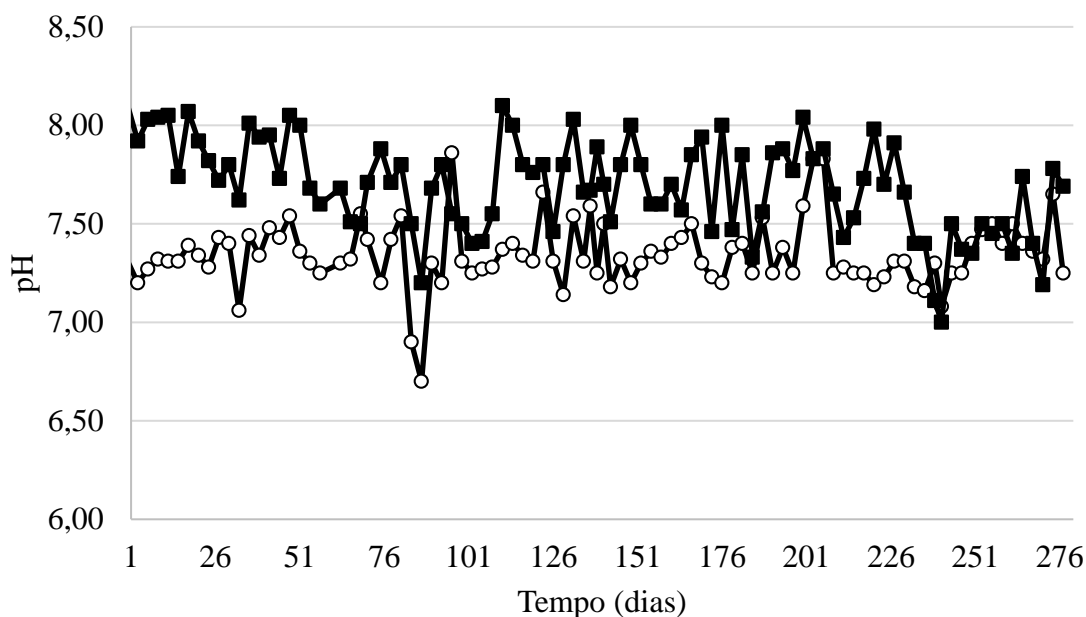


Tabela 5.21. Valores de alcalinidade afluente e efluente do RLF

	Alcalinidade Afluente (mgCaCO ₃ L ⁻¹)			Alcalinidade Efluente (mgCaCO ₃ L ⁻¹)		
	Parcial	Total	Intermediária	Parcial	Total	Intermediária
Fase I	166±42	196±29	41±12	209±56	279±70	66±20
Fase II	249±49	316±70	72±28	238±63	311±85	86±23
Fase III	214±44	279±52	69±16	249±44	312±78	78±21
Fase IV	158±23	214±30	53±13	192±34	250±40	56±22

5.4.2.6 Ácidos orgânicos voláteis

Durante toda a operação do reator foi observado concentrações reduzidas de ácidos orgânicos voláteis efluente (Figura 5.34 e Tabela 5.22). Maior concentração de AOV foi observada na fase IV, na ausência do nitrato, mas com $89,7 \pm 39,2$ mg L⁻¹ de etanol. Enquanto, maior concentração do ácido acético ($52,11 \pm 5,3$ mg L⁻¹) efluente foi observada na fase I ($100 \pm 18,26$ mg EtOH L⁻¹ e 89 ± 14 mg NO₃ L⁻¹).

Maior remoção do etanol foi observada na fase IV com $99,7 \pm 1,2\%$ a partir de $89,7 \pm 39,2$ mg EtOH L⁻¹ afluente; enquanto na fase I, fase II e fase III os valores observados foram de $92,9 \pm 1,4\%$ (para $74,7 \pm 35,5$ mg L⁻¹ afluente); $92,3 \pm 8,0\%$ (para $91,4 \pm 30,9$

mgEtOH L⁻¹ afluente) e $70,5 \pm 2,3\%$ (para $100 \pm 18,2$ mgEtOH L⁻¹ afluente), respectivamente. A concentração de etanol efluente foi em média de $5,6 \pm 0,5$ mg L⁻¹; $5,6 \pm 0,5$ mg L⁻¹; $24,7 \pm 18$ mg L⁻¹; $1,3 \pm 3,0$ mg L⁻¹ para as fases I, II, III e IV, respectivamente.

Na Fase IV a maior concentração de ácidos orgânicos voláteis pode ser relacionada com a indução do desequilíbrio do sistema e favorecimento de populações acidogênicas em função da ausência do nitrato como principal aceptor de elétrons no metabolismo microbiano (MUNZ et al., 2019). Nesta fase, observou-se maior remoção de fármacos provavelmente favorecida por essas condições. Dessa forma, pode-se inferir que na fase sem nitrato e maior concentração de AOV observados na Fase IV foram favoráveis para maior remoção do diclofenaco e ibuprofeno.

Figura 5.34. Valores de AOV e álcool do efluente nas diferentes fases de operação do RLF

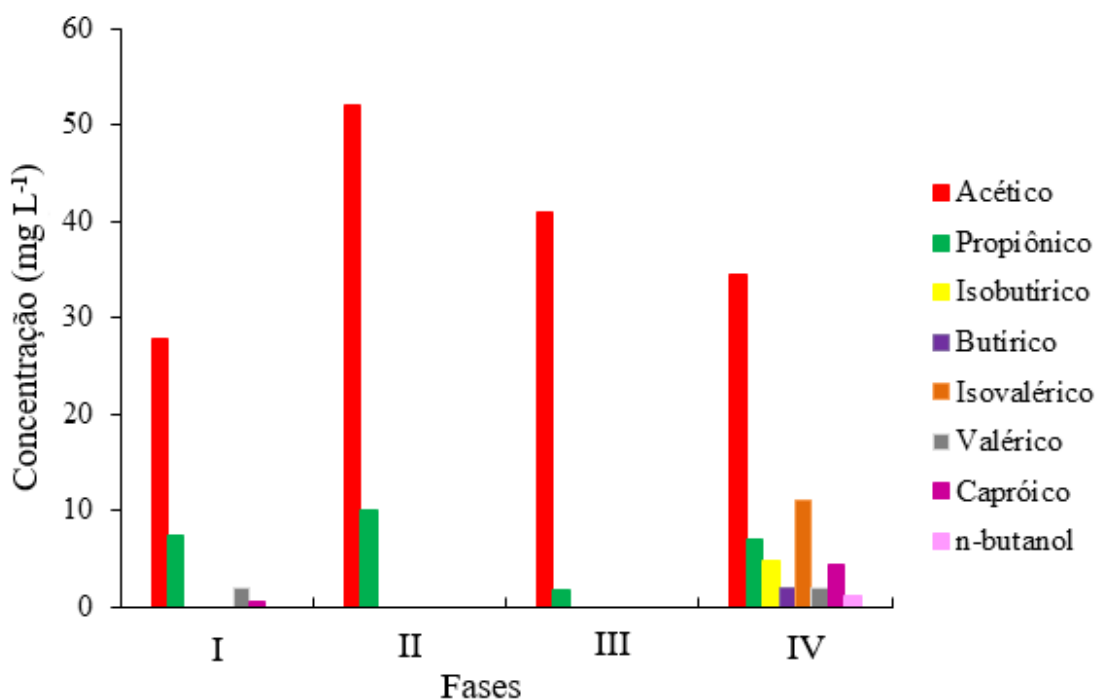


Tabela 5.22. Ácidos orgânicos voláteis em cada fase operacional do RLF

	Concentração (mg L ⁻¹)	Fase I		Fase II		Fase III		Fase IV	
		Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Ácido acético	mínimo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD
	máximo	18,35	72,35	75,78	89,41	110,14	96,41	75,59	361,77
Ácido propiônico	mínimo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD
	máximo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	5,32	≤LD	26,37	42,60
Ácido isobutírico	mínimo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD
	máximo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	7,6	8,10
Ácido butírico	mínimo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD
	máximo	≤LD	17,92	5,26	≤LD	9,48	≤LD	6,12	4,62
Ácido isovalérico	mínimo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD
	máximo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	17,99	19,41
Ácido valérico	mínimo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD
	máximo	≤LD	1,83	3,27	≤LD	≤LD	≤LD	5,75	4,77
Ácido capróico	mínimo	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD
	máximo	≤LD	0,49	≤LD	1,94	≤LD	≤LD	7,07	6,75
Etanol	mínimo	65,0	4,71	70,0	≤LD	67,0	≤LD	80,0	≤LD
	máximo	122,87	5,99	100,8	15,17	100,2	4,89	162,30	6,75

LD = limite de detecção

5.4.2.7 Sólidos

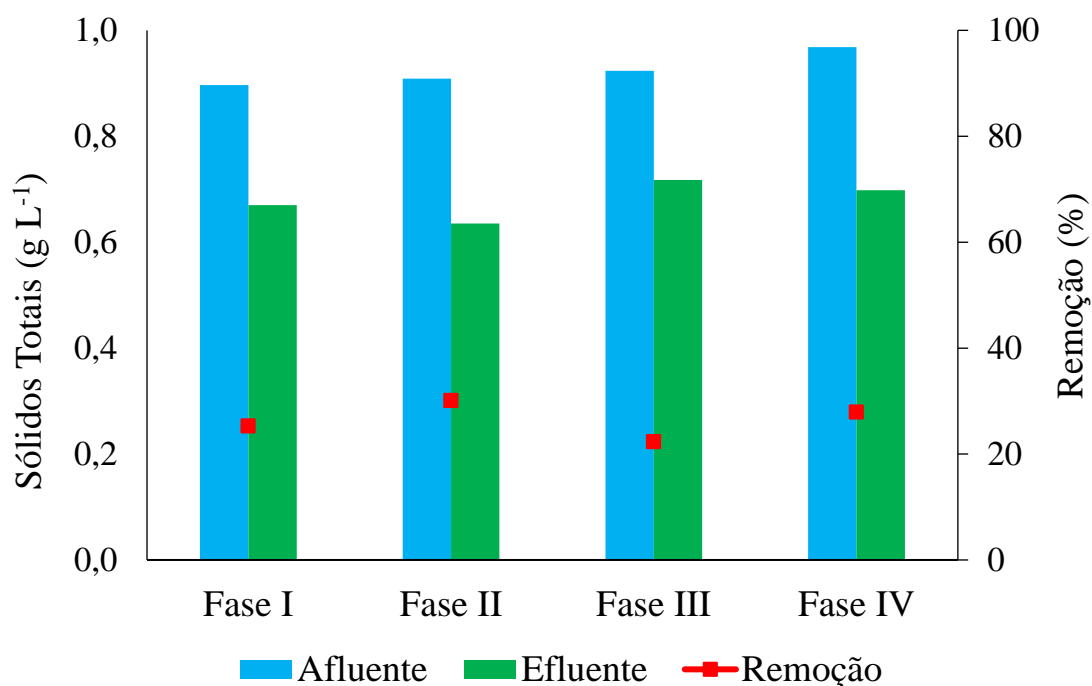
Diferença significativa não foi observada para os valores de sólidos totais efluente entre as fases de operação, sendo de $0,67 \pm 0,35 \text{ g L}^{-1}$ (Fase I); $0,63 \pm 0,51 \text{ g L}^{-1}$ (Fase II); $0,71 \pm 0,31 \text{ g L}^{-1}$ (Fase III) e $0,68 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ (Fase IV). Além disso, maior parte quantitativa dos sólidos totais efluente foram correspondentes aos sólidos totais voláteis, relacionados aos microrganismos que possivelmente foram desprendidos no leito de areia, no reator ou no separador de fases (Tabela 5.23 e Figura 5.35).

Bem como, para os sólidos totais afluente, não foi observada diferença significativa entre as fases operacionais, sendo de $0,89 \pm 0,59 \text{ g L}^{-1}$ (Fase I); $0,91 \pm 0,33 \text{ g L}^{-1}$ (Fase II); $0,93 \pm 0,38 \text{ g L}^{-1}$ (Fase III) e $0,97 \pm 0,24 \text{ g L}^{-1}$ (Fase IV).

Tabela 5.23. Série sólidos afluente e efluente ao RLF

Fases de operação	Sólidos Totais afluente (g L^{-1})		Sólidos Totais efluente (g L^{-1})	
	ST	STV	ST	STV
Fase I	$0,89 \pm 0,59$	$0,32 \pm 0,23$	$0,67 \pm 0,35$	$0,45 \pm 0,03$
Fase II	$0,91 \pm 0,33$	$0,71 \pm 0,32$	$0,63 \pm 0,50$	$0,55 \pm 0,05$
Fase III	$0,92 \pm 0,38$	$0,83 \pm 0,40$	$0,71 \pm 0,30$	$0,65 \pm 0,32$
Fase IV	$0,97 \pm 0,24$	$0,88 \pm 0,18$	$0,69 \pm 0,20$	$0,60 \pm 0,15$

Figura 5.35. Distribuição de sólidos totais afluente e efluente nas diferentes fases de operação do RLF



5.4.2.8 Caracterização microbiana

A comunidade microbiana foi caracterizada com a finalidade de obter informações acerca da sua composição nas diferentes fases de operação do RLF (Inóculo, Fase I, Fase III, Fase IV).

Para a amostra do inóculo, observou-se maior abundância relativa dos filos Proteobacteria (65,55%), Verrumicrobiota (15,55%), Bacteroidetes (12,49%), Actinobacteria (2,36%) e Firmicutes (0,86%). Granatto et al. 2021 reportaram maior abundância relativa de Proteobacteria em reatores descontínuos contendo DCF e IBU. Semelhante ao presente estudo, os autores mencionados utilizaram etanol como co-substrato metabólico (200 mg COD L⁻¹), todavia em condições fermentativas-metanogênicas. A maior abundância (65,55%) para o filo Proteobacteria, cujos membros tem ampla diversidade e capacidade metabólica, pode estar relacionada com a configuração reacional e nutricional do sistema de lodos ativados, também comumente identificados na biomassa de reatores anóxicos (Andrade et al., 2017; KS et al., 2016).

Em relação a Fase I, foram identificados os filos Proteobacteria (30,17%), Thermotogota (14,75%), Bacteroidetes (14,46%) e Firmicutes (9,97%). Para a Fase III, foram identificados os filos Proteobacteria (24,42%), Campilobacteria (21,40%), Bacteroidetes (17,13%), Desulfobacteria (11,65) e Cloroflexi (6,05). Na Fase IV na ausência de nitrato e em TDH de 18 ± 2 h, foram identificados os filos Desulfobacteria (35,21%), Spirochaeta (29,28%), Bacteroidetes (19,78%), Firmicutes (5,13%) e Thermotogota (3,55%).

Em suma, as maiores diferenças entre os filos identificados estão relacionadas a Proteobacteria, uma vez que sua abundância relativa foi decrescente, tanto em relação ao inóculo, quanto em relação à biomassa das diferentes fases de operação do reator, de 65,5% no inóculo a 0,10% na Fase IV. A partir deste fato, é possível inferir que as características operacionais do RLF utilizado no presente estudo não foram favoráveis a bactérias deste filo, uma vez que nesta configuração reacional tem-se alta turbulência da massa líquida, recirculação e crescimento microbiano na forma de biofilme aderido ao material suporte. Ademais, durante a Fase IV, houve a retirada do nitrato (acceptor de elétrons) na alimentação do RLF, o que pode ter interferido diretamente em outras possibilidades metabólicas, influenciando assim mudanças nas populações principalmente àquelas relacionadas a este filo.

De forma contrária, a abundância relativa de Bacteroidetes foi crescente em relação ao inóculo e aquela da Fase IV (de 12,49 a 19,78%, respectivamente). Uma das características de organismos deste filo é seu potencial de degradação de compostos de alto peso molecular, como proteínas e carboidratos (THOMAS et al., 2011). Além disso, tal filo foi reportado em pesquisas anteriores como relacionado à degradação de fármacos, entre eles o IBU em água residuária de hospital, contendo 10 µg IBU L⁻¹ (GALLARDO-ALTAMIRANO et al., 2019; TIWARI et al., 2019). De acordo com Gallardo-Altamirano et al. (2019), a degradação de compostos farmacêuticos ativos pode ocorrer por membros de tal filo, tanto em condições anaeróbias, quanto anóxicas, o que pode justificar a constância de sua abundância relativa ao longo da operação do RLF, tanto nas fases contendo NO₃⁻ (Fases I e III), quanto sem NO₃⁻ (Fase IV).

Da mesma forma, é possível inferir que as condições operacionais aplicadas no RLF foram favoráveis à Desulfobacterota, uma vez que sua abundância relativa passou de <0,01% no inóculo para 29,28% na Fase IV. Membros deste filo realizam a redução do sulfato e degradação de compostos aromáticos (MURPHY et al., 2021). De acordo com Granatto et al. (2019), que monitoraram por período de 12h a composição do mesmo esgoto doméstico utilizado no presente estudo, da ETE de São Carlos-SP (Brazil), a concentração de sulfato era de 82,0 ± 56,5 mg L⁻¹. Desta forma, é possível inferir que a alimentação do reator RLF na Fase I foi propícia ao estabelecimento de bactérias deste filo devido ao sulfato além dos fármacos que fizeram parte da alimentação das fases posteriores (Fases II e III) (DATEL; HRABANKOVA, 2020), favorecendo maior abundância relativa.

Ainda, em relação à alteração da abundância relativa dos diferentes filos identificados, foi possível notar que, tanto no inóculo, quanto na Fase I, houve baixa abundância relativa de Cloroflexi (0,02 – 0,84%, respectivamente). Entretanto, aumento substancial foi observado na Fase III (6,05%), possivelmente devido à adição dos fármacos em tal etapa, uma vez que organismos deste filo podem participar da degradação de compostos halogenados e possuir afinidade com os átomos de cloro que compõe a molécula do DCF (KRZMARZICK et al., 2012; GRANATTO et al., 2020c).

Algumas das etapas necessárias à degradação de DCF e IBU, como clivagem de compostos aromáticos e descloração redutiva, podem estar relacionadas aos representantes da família Geobacteraceae (Medina et al., 2014). Durante a Fase IV, observou-se maior degradação do DCF e IBU, o que pode estar relacionado com abundância relativa predominante, tanto desta família (28,85%), quanto de Spirochaetaceae, sendo 27,9% na Fase IV; 2,8% na Fase III; 1,6% na Fase I. De acordo com Medina et al. (2014), tais famílias

são compostas por bactérias de metabolismo acidogênico. Portanto, uma vez que houve aumento da concentração de VFA no efluente do RLF na Fase IV (226 ± 23 mg HAc L⁻¹), é possível inferir que esta via foi favorecida na ausência de nitrato. Além da maior concentração total de VFA na Fase IV, houve ainda maior diferenciação na composição dos ácidos orgânicos, sendo observados os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, caproico e n-butanol, enquanto nas demais fases houve predominância de ácido acético.

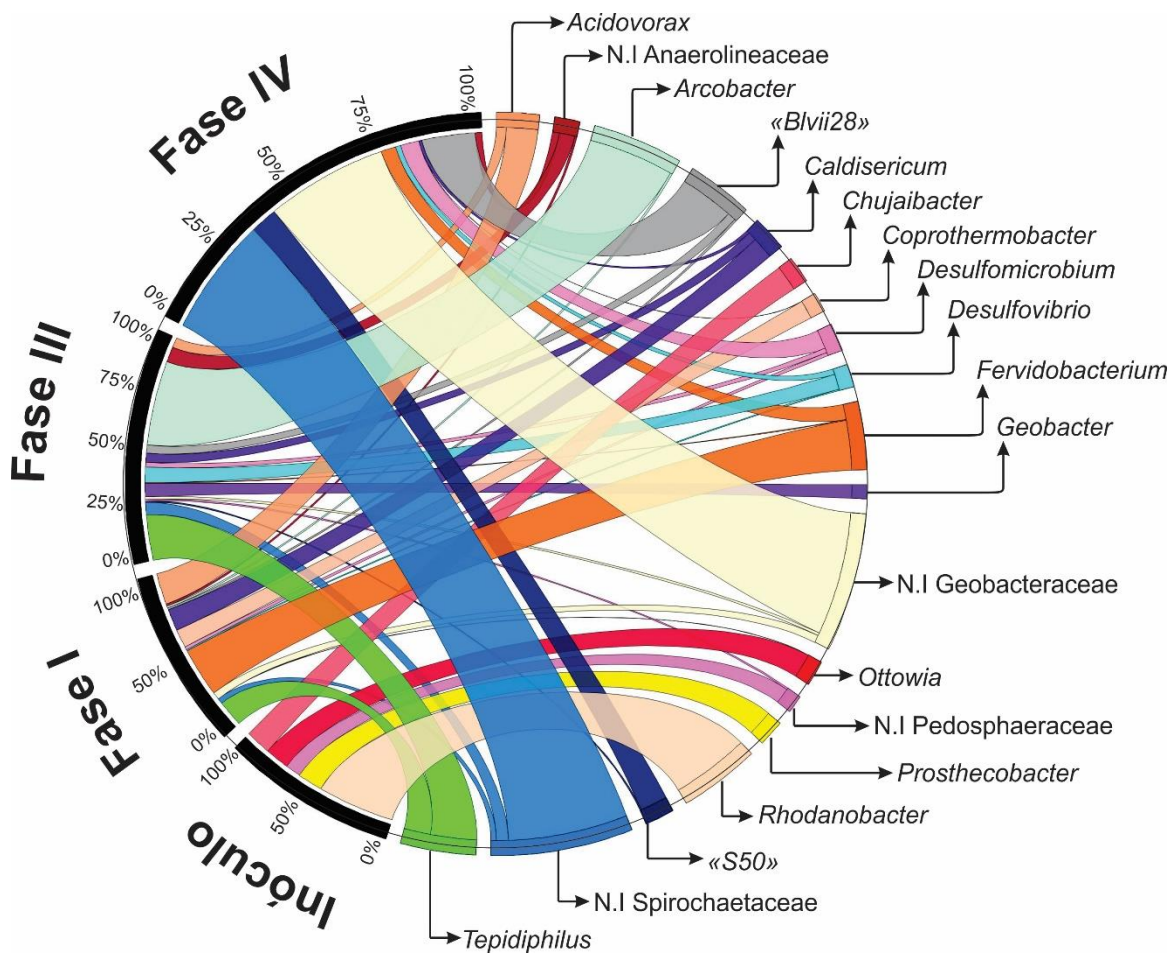
Foi representado o total de 19 gêneros (Figura 5.36) sendo que, cada gênero esteve entre os 5 mais abundantes em pelo menos em uma das amostras. Nas fases de alimentação com nitrato (Fases I, II e III) foram identificados gêneros desnitrificantes no reator de leito fluidificado, como *Rhodanobacter* (25.33%), *Acidovorax* (9.38%), *Caldisericum* (6.55%), *Desulfovibrio* (3.62%), *Dechloromonas* (2.78%), *Thauera* (2.20%), *Zoogloea* (0.46%), *Acinetobacter* (0.36%) e *Pseudomonas* (0.11%). Na desnitrificação estão envolvidas as enzimas nitrato redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase. A redução desassimilativa de nitrato a nitrogênio possivelmente foi predominante na Fase I, uma vez que a remoção de nitrato foi de $97,2 \pm 3,7\%$. Assim, é possível inferir que o etanol foi o principal doador de elétrons nesta etapa de ocorrência da desnitrificação heterotrófica. De forma similar, na Fase III, com nitrato, a remoção observada foi de $93,2 \pm 2,6\%$.

Rhodanobacter, gênero identificado em maior abundância relativa no inóculo (25,33%) foi também identificado nas amostras das demais fases em $\leq 0,01\%$. Assim, é possível inferir que as condições operacionais aplicadas no RLF não foram favoráveis a estas bactérias. *Rhodanobacter* é um gênero comum em sistemas de lodos ativados, sendo este resultado condizente com as características do inóculo utilizado no presente estudo. Entretanto, de acordo com Navrozidou et al. (2019), tais bactérias podem estar relacionadas à degradação de anti-inflamatórios e drogas não esteroidais, como diclofenaco e ibuprofeno.

Acidovorax, identificada em maior abundância relativa nas Fases I e III (9.38 e 2.38%, respectivamente), são bactérias quimiorganotróficas, que metabolizam ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos como substrato, além de nitrato como acceptor de elétrons via desnitrificação heterotrófica (Brenner et al., 2005). Além disso, *Acidovorax* são comumente identificados em reatores de estações de tratamento de esgoto sanitário e reportados por participarem da degradação de fármacos anti-inflamatórios (NAVROZIDOU; MELIDIS; NTOUGIAS, 2019) e antibióticos, além de usualmente relacionados à degradação de compostos aromáticos (Brenner et al., 2005). Sendo assim, é possível inferir que a adição de nitrato teve efeito positivo na prevalência destes

organismos. De forma similar, Zhou et al. (2019) observaram relação positiva da prevalência deste gênero com a presença de nitrato e com a remoção de nitrogênio total em reatores em bateladas sequenciais com esgoto sanitário, acrescido de 1 – 5 mg L⁻¹ de IBU afluente.

Figura 5.36. Representação gráfica dos microrganismos identificados em maior abundância relativa nas amostras de inóculo e diferentes fases de operação do RLF



Fase I: nitrato (136 ± 59 mg L⁻¹) etanol (74.7 ± 9.2 mg L⁻¹) em TDH 18 ± 3 h; Fase III: nitrato (100 ± 10 mg L⁻¹) etanol (98.0 ± 16.8 mg L⁻¹) em TDH 12 ± 1 h; Fase IV: etanol (89.6 ± 39.2 mg L⁻¹) em TDH 18 ± 2 h; N.I.: gênero não identificado.

Bactérias do gênero *Caldisericum* são anaeróbias estritas e quimiorganotróficas, as quais consomem carboidratos e produzem ácidos graxos de cadeia curta via redução de compostos sulfurosos. Este gênero foi identificado em maior abundância relativa na

biomassa da Fase I. Membros deste gênero são relacionados a degradação de compostos fenólicos (CHEN et al., 2016).

Os gêneros *Thauera*, *Geobacter* e *Desulfovibrio* tem sido reportados amplamente com potencial de degradação de fármacos (HWANG et al., 2005; ARIAS et al., 2018; XU et al., 2018; GRANATTO et al., 2019). *Desulfovibrio* são bactérias anaeróbias redutoras de sulfato e nitrato, capazes de degradar carboidratos, aminoácidos, compostos aromáticos, além de realizar dessulfonação (Brenner et al., 2005; Heidelberg et al., 2004). *Thauera* tem sido bastante reconhecido pela capacidade desnitrificante e pela degradação de compostos fenólicos (Manefield et al., 2002).

Geobacter foi identificado em maior abundância relativa na Fase IV (28.85%), na ausência de nitrato afluyente. Uma vez que estes microrganismos são anaeróbios estritos e redutores de ferro, a ausência de nitrato pode ter favorecido o aumento da abundância relativa deste gênero. De acordo com o monitoramento do esgoto doméstico realizado por Granatto et al. (2019) (ETE de São Carlos-SP), a concentração de ferro total observada foi entre <0.005 e 2.2 mg L^{-1} .

De forma contrária, *Zoogloea* foi identificado em maior abundância relativa na Fase I (0.46%) e na Fase III (0.20%), sendo que em ambas as fases foi adicionado nitrato na alimentação do RLF (136 ± 59 e $100 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). Este gênero tem sido reconhecido pela capacidade de degradação de compostos aromáticos (Brenner et al., 2005) e recalcitrantes, como óleos e graxas (Jin et al., 2006). Delforno et al. (2019); Okada et al. (2013) e Andrade et al. (2017) relacionaram este gênero à remoção de compostos aromáticos em água residuária de lavanderia. A abundância relativa de *Zoogloea* reportada pelos autores supracitados foi de 0,1%, 15,8% e 22,14% em biomassa de reatores Expanded Granular Sludge Bed (EGSB), Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) e RLF, respectivamente.

Além das bactérias mencionadas, foram identificadas em menores proporções outras bactérias desnitrificantes, tais como *Acinetobacter*, especialmente na Fase I (0,36%). Bactérias deste gênero tem metabolismo altamente versátil, e tem sido relatadas em sistemas biológicos devido ao seu potencial de degradação e tolerância a compostos recalcitrantes (GOU et al., 2019; GU et al., 2019; YANG et al., 2021).

Sob condições metanogênicas, Granatto et al., (2021) realizaram a caracterização taxonômica da biomassa de EGSB em escala aumentada, alimentado com esgoto sanitário (ETE de São Carlos-SP, Brasil), acrescido de $200 \text{ mg COD L}^{-1}$ de co-substrato (etanol, etanol + metanol ou fumarato), além dos fármacos DCF e IBU. Segundo os autores, etanol

foi o co-substrato que mais favoreceu a remoção dos fármacos, sendo que os principais gêneros identificados em tais condições foram *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Macellibacteroides*, *Syntrophus*, “*Blvii28_wastewater-sludge_group*”, *Bacteroides* e *Caldisericum*. Tais microrganismos também foram identificados no presente estudo e relacionados à degradação dos fármacos DCF e IBU na presença de etanol como co-substrato. Gusmão et al., (2007) identificaram *Bacteroides* em reator horizontal de leito fixo operado em sistema plug flow para remoção de hidrocarbonetos aromáticos (BTEX), na fase com nitrato como aceptor de elétrons para as bactérias desnitrificantes. Neste sistema pode ocorrer a formação de zona anaeróbia favorecida pelo sistema plug flow proporcionando condições mínimas para bactérias deste gênero.

Os principais gêneros do filo Desulfobacterota identificados na Fase IV foram *Desulfobibrio* (3,62%), *Geobacter* (3,16%) e *Desulfobulbus* (2,21%), usualmente descritos como anaeróbios Gram-negativos e redutores de sulfato, promovendo a oxidação incompleta de lactato a acetato (Brenner et al., 2005). Representantes destes gêneros são fundamentais na dessulfonação e degradação de compostos aromáticos sulfonados, como surfactante aniônico LAS (Andrade et al., 2017; Oliveira et al., 2010; Granatto et al., 2019), sendo, portanto, possível inferir sua importância para a degradação de DCF, uma vez que este composto possui anéis aromáticos em sua conformação molecular. Além disso, o sulfato da composição do esgoto doméstico utilizado na alimentação do reator (Granatto et al., 2019) pode ter favorecido tais organismos.

Os gêneros predominantes identificados na Fase I, com adição de nitrato e etanol e TDH de 18 ± 3 h, foram as bactérias semelhantes à *Fervidobacterium* (14.71%), *Acidovorax* (9.38%), *Tepidiphilus* (7.89%), *Caldisericum* (6.55%), além de Comamonadaceae, Hydrogenedensaceae, *Streptococcus* e *Dechloromonas*, com abundância relativa $\leq 4.0\%$.

Bactérias do gênero *Fervidobacterium* são anaeróbias estritas e fermentadoras de ampla variedade de carboidratos, incluindo glicose, amido, lactose e sacarose. Estes representantes não utilizam os ácidos orgânicos voláteis e álcoois para crescimento (NAM et al., 2002), e são comumente envolvidos no metabolismo de benzeno (SARKAR et al., 2016). Observou-se maior abundância relativa deste gênero na Fase I (14.71%) em relação às demais fases (III= 0.17%; IV= 3.55%).

Tepidiphilus, da classe Betaproteobacteria, são produtores de catalases e oxidases, importantes na redução do nitrato. Organismos deste gênero são quimiorganotróficos e utilizam ácidos orgânicos como única fonte de carbono (PODDAR; LEPCHA; DAS, 2014). Neste estudo, este gênero foi identificado em abundância relativa de 7,89% na Fase I e

10,66% na Fase III. Provavelmente, o nitrato afluente na Fase III tenha sido fundamental para o favorecimento deste gênero.

Ao final da Fase III (TDH= 12 ± 1 h), bactérias semelhantes à *Arcobacter* (19.89%) foram identificadas em maior abundância relativa, no biofilme aderido na areia. Microrganismos deste gênero são aeróbios facultativos e quimiorganotróficos, usam ácidos orgânicos e carboidratos como fonte de carbono, além de assimilar o nitrato como acceptor de elétrons (ROALKVAM et al., 2015). Fróes et al. (2016) identificaram prevalência (90%) deste gênero em amostras de efluente hospitalar do Rio de Janeiro – RJ (Brazil) com a mesma concentração de matéria orgânica ($397 \text{ mg COD L}^{-1}$) obtida neste estudo para a Fase III do RLF ($400 \text{ mg COD L}^{-1}$). Em contrapartida, tal gênero não foi identificado na Fase IV (TDH= 18 ± 2 h), possivelmente devido a pressão seletiva de maior TDH, ainda que na presença dos fármacos e esgoto doméstico.

Na Fase IV do reator, Geobacteraceae (28.85%), Spirochaetaceae (27.98%), “*Blvii28_wastewater-sludge_group*” (12.62%) e “*S50_wastewater-sludge_group*” (6.41%) foram identificadas em maiores proporções. Além de *Desulfomicrobium* (4.39%), *Fervidobacterium* (3.55%), Peptococcaceae (3.44%) e Anaerolineaceae (1.61%). Bactérias semelhantes a “*Blvii28_wastewater-sludge_group*” realizam β - ω -oxidação e participam da degradação de anéis aromáticos. De forma similar ao observado no presente estudo, Wang et al. (2020) relataram correlação positiva da abundância relativa do gênero “*Blvii28_wastewater-sludge_group*” (5,01%) com eficiência de remoção de matéria orgânica e de compostos recalcitrantes em águas residuárias petroquímicas, possivelmente devido à sua tolerância a compostos tóxicos e versatilidade para degradação de constituintes aromáticos. O aumento do TDH na Fase IV (18 ± 2 h), além da supressão de nitrato afluente, teve como consequência relação COD/NO₃⁻ superior (33,7) quando comparada às demais Fases (2,28; 4,09 e 3,60, respectivamente), afetando negativamente a desnitrificação heterotrófica, uma vez que o nitrato deixou de ser o acceptor de elétrons preferencial, cuja remoção observada foi de $93,2 \pm 2,6\%$ para $32,6 \pm 16,2\%$, e maior consumo de etanol, de $70,5 \pm 2,3\%$ para $99,7 \pm 1,2\%$. Sendo assim, é possível inferir que a concentração de nitrato afluente na Fase IV levou ao desequilíbrio das populações desnitrificantes no RLF, e favorecimento de populações acidogênicas em função da ausência do nitrato como principal acceptor de elétrons da respiração anóxica (MUNZ et al., 2019).

5.4.2.9 Inferência de perfil funcional

Após a inferência metabólica via *Tax4Fun2*, foi possível observar as prováveis KO relacionadas às amostras analisadas, no total de 7.116 KO para a amostra do Inóculo, 7.304 para a amostra da Fase I, 7.310 para a Fase III e 4.543 para a Fase IV, para as quais foi calculado seu percentual nas vias metabólicas de interesse. Vale mencionar que a ferramenta aplicada à predição dos genes codificantes das possíveis enzimas envolvidas no processo infere no conteúdo funcional de genes microbianos com base em informações estabelecidas em relação ao genoma dos organismos taxonomicamente mais próximos dos identificados nas amostras a partir de dados de sequenciamento de rRNA 16S procariótico (WEMHEUER et al., 2020).

Os níveis metabólicos relacionados à degradação, tanto dos fármacos, quanto remoção de etanol e nitrato foram filtrados de acordo com as categorias da base de dados KEGG (Figura 5.37). O nível onde se observou maiores proporções foi a via da fosforilação oxidativa, na amostra do Inóculo (0,9%), Fase I (0,8%) e Fase III (1,1%), possivelmente devido à grande importância da β -oxidação (GONZALEZ-GIL et al., 2016; DELFORNO et al., 2019; GRANATTO et al., 2020b) na degradação dos fármacos, além do potencial anaeróbio facultativo da biomassa envolvida no processo.

Vale ressaltar que as etapas de biotransformação aeróbia do IBU (hidroxilação, carboxilação, descarboxilação) podem ocorrer mesmo em condições anaeróbias (GRANATTO et al., 2020b).

Ainda, em relação às vias diretamente envolvidas na degradação de fármacos, destacam-se a degradação de compostos aromáticos (0,3-0,6%) e de degradação de benzoato (0,1-0,8%), onde ocorre a conversão da molécula de benzoil-CoA em acetil-CoA e/ou acetaldeído e piruvato. Além disso, foram observadas proporções similares para a via glicolítica em todas as amostras analisadas (0,9%), sendo esta via de suma importância para a assimilação de etanol, por meio de sua conversão em acetaldeído (Equação 5.15), que por sua vez pode ser metabolizado à acetato (Equação 5.16) e/ou acetil-CoA (Equação 5.16).

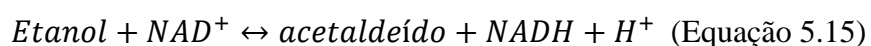
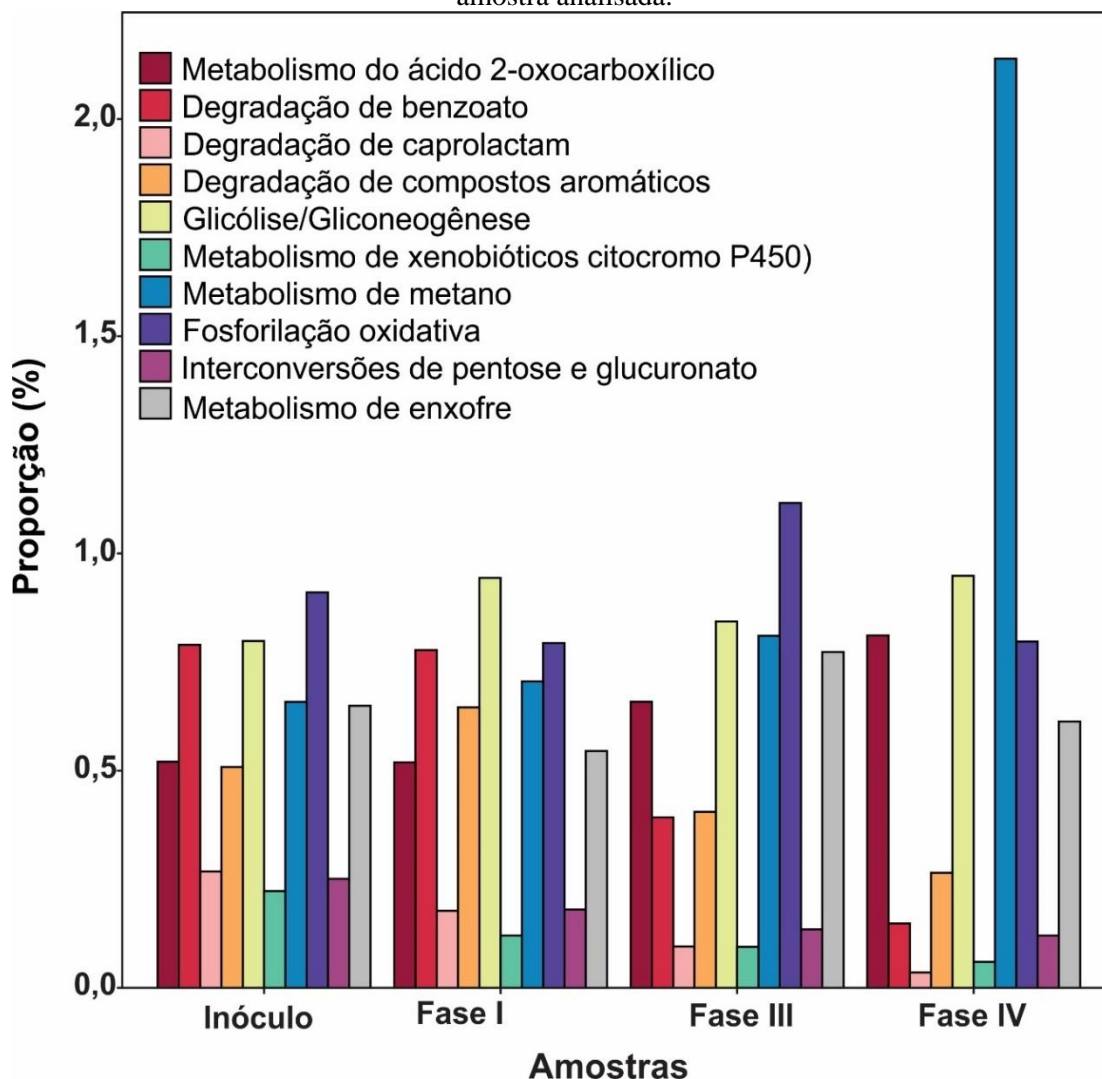
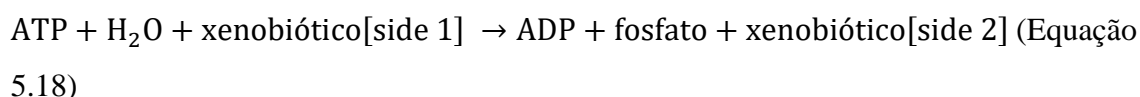


Figura 5.37. Principais KO envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos e/ou álcoois nas vias Glicolítica e Metabolismo do Piruvato em RLF aplicado à degradação de fármacos (ibuprofeno e diclofenaco) com etanol e nitrato. As KO foram estimadas a partir do pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6. As proporções foram calculadas de acordo com o número total de KO obtidos para cada amostra analisada.



A degradação dos fármacos DCF e IBU é iniciada após seu transporte do meio extracelular para o interior da célula pela ação de transportadores de xenobióticos do tipo ABC [7.6.2.2]. A reação catalisada por esta enzima requer uma molécula de ATP para que ocorra o transporte do xenobiótico, como descrito na Equação 5.18.

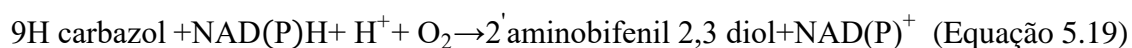


Sendo, tanto o DCF ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2$), quanto o IBU ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$) compostos com mais de dez carbonos, além de conter anéis aromáticos, podem ser utilizados como substrato

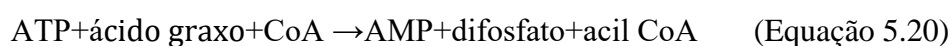
para a enzima alpha-methylacyl-CoA racemase/ibuprofenoyl-CoA epimerase [5.1.99.4]. Além disso, vale ressaltar a importância da catalase [1.11.1.6], que atua como uma pseudoperoxidase, com afinidade pelo etanol como doador de hidrogênio, formando acetaldeído por meio desta reação. Vale ressaltar a importância da adição de etanol como co-substrato neste processo, uma vez que em condições anaeróbias, ou anaeróbias facultativas, os gêneros *Smithella*, *Desulfovibrio* e *Desulfobulbus* podem utilizar este álcool como doador de elétrons. Desta forma, mantendo suficiente ATP no sistema por meio da adição de co-substratos, a fosforilação de tais fármacos é favorecida (GONZALEZ-GIL et al., 2016; DELFORNO et al., 2019; GRANATTO et al., 2020b).

Em relação ao DCF, vale ressaltar que devido aos átomos de cloro em sua estrutura molecular, organismos do filo Chloroflexi podem estar envolvidos em sua degradação e desalogenação (GRANATTO et al., 2020b), graças ao cytochrome P450-dependent pathway (CHEN et al., 2020a). No presente estudo, Chloroflexi foi identificado em maior abundância relativa na Fase III (6,05%) em relação às demais etapas.

Na primeira etapa de degradação do carbazole, um dos compostos intermediários formados durante a degradação do DCF, e posteriormente ao fenilacetato, intermediário em comum à degradação do IBU (SHARMA et al., 2019), é catalisada pela enzima carbazole 1,9 α -dioxygenase [1.14.12.22] (Equação 5.19).



Além disso, a degradação do DCF pode ocorrer através de sua redução e remoção dos átomos de cloro, seguida pela descarboxilação do phenylacetate via β -oxidação, bem como para Benzoyl-CoA, com a formação de acetato a partir de Acetyl-CoA (IVSHINA et al., 2019), sendo estes mesmos compostos intermediários da clivagem dos anéis aromáticos do IBU (GHATTAS et al., 2017; GRANATTO et al., 2020b). A adição da Coenzima A ao longo da degradação do IBU e DCF ocorre devido a ação da enzima *long-chain-fatty-acid-CoA* ligase [6.2.1.3], por meio da oxidação de um octano, como o fenilacetato ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$), que pode ocorrer pelas reações descritas nas Equações 5.20 e 5.21.



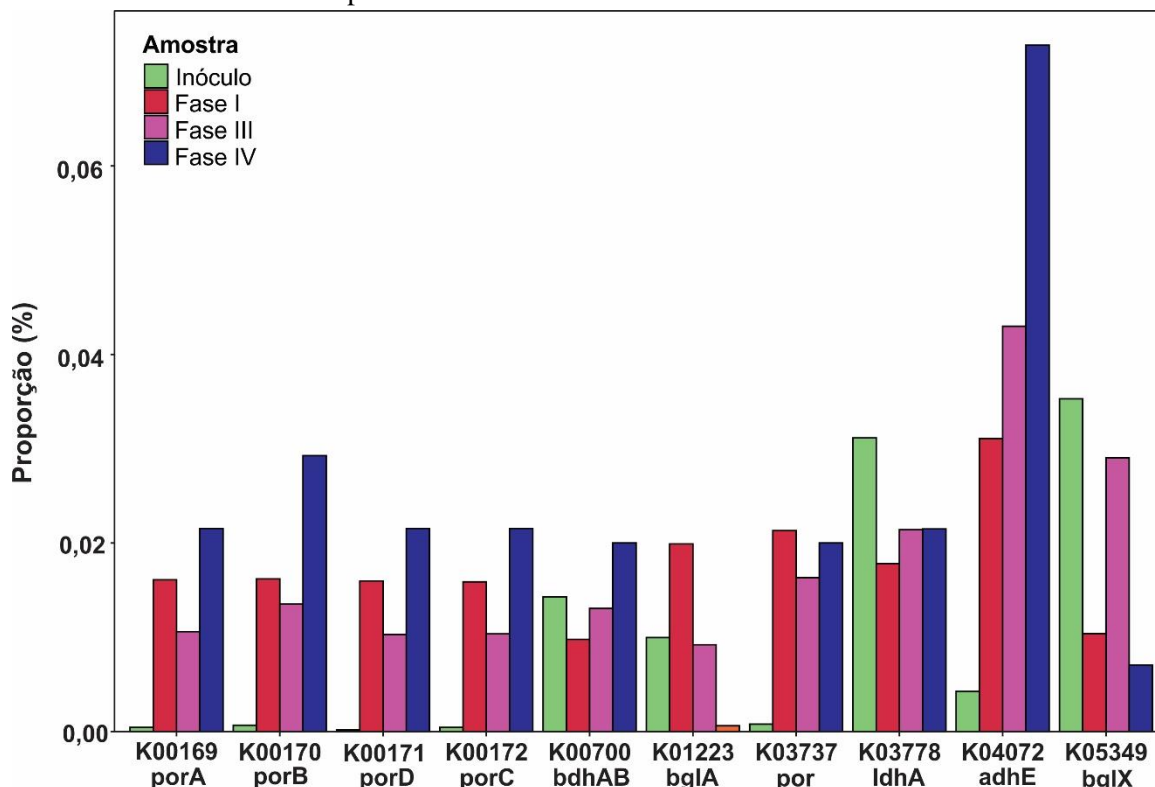
Vale salientar que o nitrato, composto adicionado no presente estudo como fonte de nitrogênio, é um dos principais aceptores de elétrons no processo de desnitrificação, onde

também há geração de benzoil-CoA como intermediário em comum à degradação dos fármacos estudados (RABUS et al 2001). A degradação do DCF em condições desnitrificantes pode culminar na formação do intermediário nitrodiclofenaco (NO-DFC), com posterior formação de NO₂-DFC (Xio-Hong et al., 2010).

Diversos genes codificantes de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos e/ou álcoois foram inferidos nas amostras analisadas (Figura 5.38), com destaque para a K04072 (adhE), envolvida na expressão da acetaldehyde dehydrogenase/alcohol dehydrogenase [1.1.1.1], responsável pela reação de interconversão entre um álcool primário em um aldeído, com concomitante redução de uma molécula de NAD⁺. Maiores proporções desta enzima foram inferidas para a Fase IV (0,07%) em relação às demais amostras (0,03-0,04%), provavelmente devido às maiores concentrações de ácido acético afluyente nesta etapa (53,6 mg L⁻¹), quando comparado às demais fases (9,8-20,5 mg L⁻¹), além do consumo total do etanol (100 mg L⁻¹).

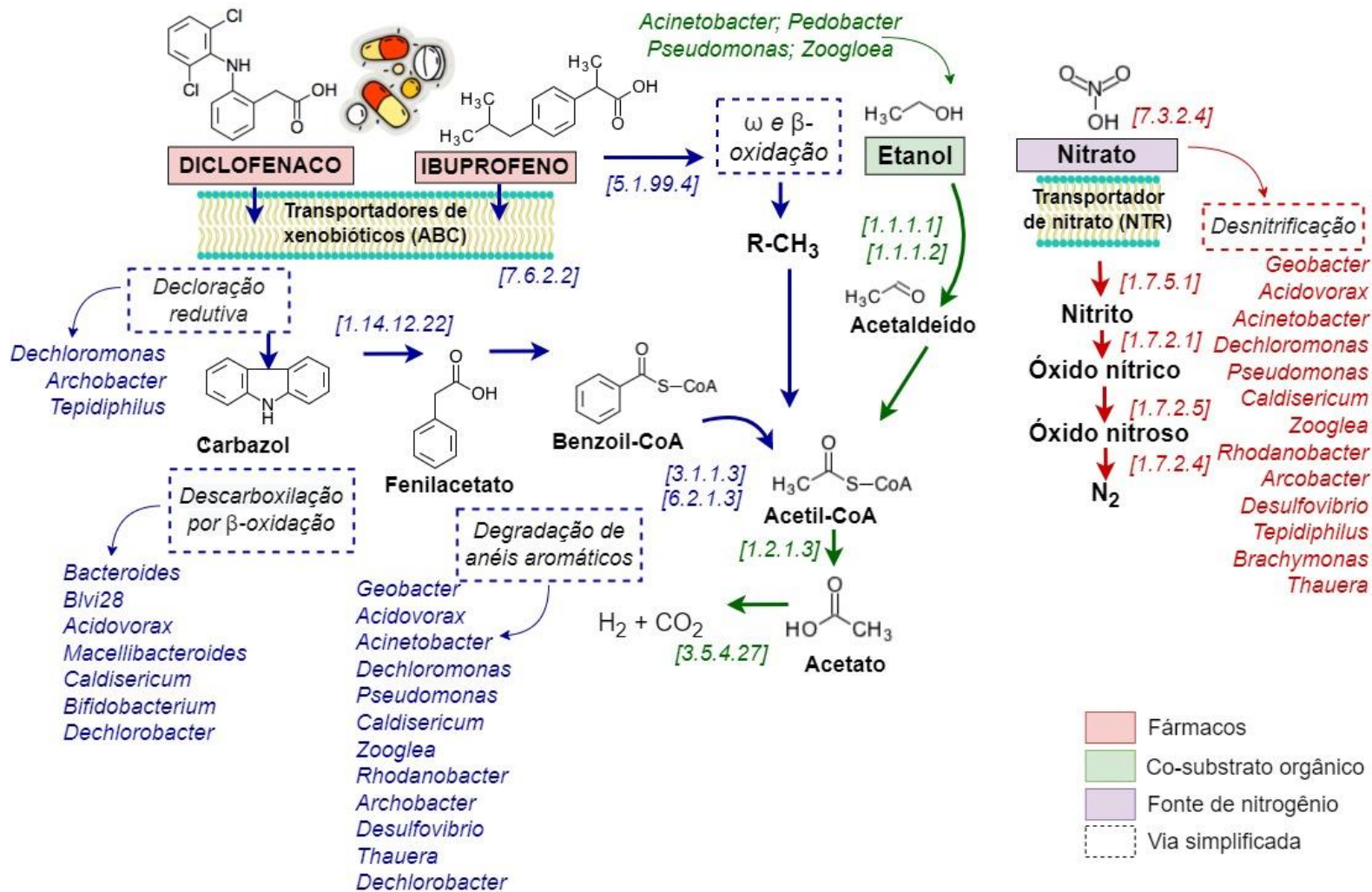
Além da adhE, as KO K00169 (0,02%), K00170 (0,03%), K00171 (0,02%), K00172 e K00700 (0,02%) foram inferidas em maiores proporções na Fase IV, sendo estas enzimas relacionadas às diferentes subunidades da família pyruvate ferredoxin oxidoreductase, que descarboxilam diferentes 2-oxoácidos formando seus derivados CoA a partir de diferentes substratos. Outro ponto de destaque é que as KO mencionadas foram inferidas em proporções <0,001% no inóculo, o que torna possível supor que as condições aplicadas no RLF, tanto em relação aos fármacos quanto em relação ao etanol e nitrato foram favoráveis aos microrganismos que expressam tais genes, com exceção da K05349 (bglX), uma β-glucosidase envolvida na hidrólise de diferentes fontes complexas de carbono (xIllose, galactose, arabinose), inferida em maior proporção na biomassa do inóculo (0,04%) e em concentrações inferiores em todas as amostras do RLF (0,01%), possivelmente devido à ausência de tais carboidratos no reator.

Figura 5.38. Principais vias metabólicas envolvidas na degradação de ibuprofeno e diclofenaco em reator RLF contendo etanol e/ou nitrato. As vias foram estimadas de acordo com as KO inferidas por meio do pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6. As proporções foram calculadas de acordo com o número total de KO obtidos para cada amostra analisada.



Uma vez que a degradação de compostos recalcitrantes depende da presença de microrganismos contendo o aparato enzimático necessário à sua degradação, a simbiose entre tais organismos no consórcio microbiano utilizado como inóculo é de extrema importância. As vias metabólicas envolvidas na degradação dos fármacos (IBU e DCF) a partir de etanol e nitrato encontram-se resumidas na Figura 5.39, bem como os principais gêneros identificados e potencialmente relacionados a cada etapa.

Figura 5.39. Potenciais vias metabólicas envolvidas em RLF aplicado à degradação de fármacos (diclofenaco e ibuprofeno) contendo etanol e/ou nitrato. Os números EC entre colchetes são referentes às enzimas potencialmente envolvidas em cada reação, e foram inferidos pelo pacote Tax4Fun2 versão 1.1.6 e via base de dados BRENDA.



6 Considerações Finais

O diclofenaco é um anti-inflamatório e micropoluente organoclorado, composto por dois anéis aromáticos e um grupamento amina que pode causar efeitos adversos aos organismos em diferentes matrizes ambientais. Nesse trabalho, foi realizado o DCCR para avaliar a remoção deste fármaco em condições desnitrificantes com etanol como doador de elétrons e nitrato como aceptor de elétrons. Os experimentos foram conduzidos em reatores em batelada, a partir das variáveis diclofenaco ($57 \pm 2,0 - 146,3 \pm 22,3 \mu\text{g L}^{-1}$), etanol ($100,5 \pm 25,3 - 278,9 \pm 13,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) e nitrato ($95,9 \pm 2,1 - 250 \pm 10,2 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$). Nestes ensaios, a maior remoção do diclofenaco ($17,5 \pm 2,3\%$) foi obtida na presença de etanol na seguinte condição: $180,5 \pm 8,2 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $80,0 \pm 2,6 \mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $183,5 \pm 28,7 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. A desnitrificação ocorreu sob todas as condições avaliadas ($>90\%$), sendo possível inferir sobre a utilização do diclofenaco como doador de elétrons, embora o etanol também tenha favorecido em maior proporção a desnitrificação heterotrófica.

O ibuprofeno é um micropoluente e anti-inflamatório, composto com um anel aromático, derivado do ácido propiônico com ação analgésica. A adição do nitrato e etanol como fontes de nitrogênio e co-substrato orgânico, respectivamente, pode ser otimizada para se obter a máxima eficiência de remoção do ibuprofeno em processos biológicos. Portanto, neste estudo, esses parâmetros também foram avaliados em reatores em bateladas sob condições desnitrificantes por meio do DCCR, a partir das variáveis ibuprofeno ($41 \pm 5,6 - 122,8 \pm 5,0 \mu\text{g L}^{-1}$), etanol ($95,3 \pm 21,9 - 233,3 \pm 0,2 \text{ mgEtOH L}^{-1}$) e nitrato ($95,9 \pm 5,0 - 264 \pm 6 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$). Nestes ensaios, a máxima remoção do ibuprofeno ($97,5 \pm 3,1\%$) foi obtida com etanol na seguinte condição: $100,9 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$; $104,2 \pm 2,4 \mu\text{gIBU L}^{-1}$; $110,6 \pm 15,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. O nitrato foi completamente removido sob todas as condições avaliadas ($>90\%$) e obteve-se $20 \pm 2,7\%$ de remoção de matéria orgânica ($366,5 \pm 3,5 \text{ mgDQO inicial L}^{-1}$). Os principais metabólitos observados ao longo do processo foram os ácidos acético ($73,9 \text{ mg L}^{-1}$), propiônico ($43,7 \text{ mg L}^{-1}$) e valérico ($4,6 \text{ mg L}^{-1}$). Dessa forma, a desnitrificação também ocorreu em todas as condições do DCCR, sendo possível afirmar que o etanol foi o principal doador de elétrons e o ibuprofeno também foi utilizado como doador via desnitrificação heterotrófica.

Nas condições dos reatores em bateladas de maior remoção do DCF e IBU foram identificadas principalmente bactérias desnitrificantes pertencentes aos gêneros

Rhodanobacter, *Haliangium*, *Terrimonas* e *Sorangium* relacionados ao ciclo do nitrogênio e degradação destes fármacos.

Em relação ao reator de leito fluidificado, observou-se que a máxima remoção de DCF ($52,9 \pm 11,4\%$) e IBU ($55,8 \pm 11,4\%$) ocorreu simultaneamente na fase IV, sem nitrato e com etanol como co-substrato, de forma contrária aos resultados obtidos em reatores em batelada. Além disso, nas fases de operação do RLF com nitrato (Fase II e III) obteve-se maior remoção do DCF ($27,6 \pm 12\%$ e $35,2 \pm 19\%$) em comparação ao reator em bateladas ($17,5 \pm 2,3\%$) em concentrações semelhantes de nitrato e etanol ($100 \pm 18,2$ mg $\text{NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $90,1 \pm 36$ $\mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $100 \pm 18,2$ mg EtOH L^{-1}). Todavia, para o ibuprofeno, nos ensaios em batelada ($97,5 \pm 3,1\%$) obteve-se maior remoção do IBU quando comparado ao RLF ($39,6 \pm 2,4\%$).

O lodo do RLF foi constituído por microrganismos importantes para a remoção dos fármacos no esgoto, com vias metabólicas relacionadas a ω e β -oxidação, dessulfonação, clivagem de anel aromático e descloração redutiva. O emprego do etanol favoreceu os microrganismos que realizam tais atividades metabólicas e maior diversidade microbiana, demonstrando ser estratégia para biorremediação de micropoluentes emergentes. Ademais, as bactérias acidogênicas e maior produção de ácidos orgânicos foram identificadas na fase operacional de maior remoção dos fármacos, ressaltando a importância metabólica da acidogênese nas condições sem nitrato, em cuja condição ocorreu maior remoção dos fármacos.

Bactérias desnitrificantes identificadas na biomassa dos reatores em bateladas e no contínuo de leito fluidificado, tais como *Pseudomonas*, *Zoogloea* e *Pedobacter* que foram relacionadas com a degradação de diclofenaco, ibuprofeno e remoção do nitrato a partir de vias de fosforilação oxidativa, β -oxidação sob condições desnitrificantes.

Ainda, pode ser destacado que a abundância relativa de *Rhodanobacter* foi decrescente ao longo da operação do RLF devido a este gênero estar associado ao metabolismo aeróbio e à prolongada exposição a compostos tóxicos, principalmente do DCF, IBU e LAS. Enquanto isso, as abundâncias relativas dos gêneros *Geobacter* (Desulfobacterota), “*Blvii28_wastewater-sludge_group*” (Bacteroidota) e “*S50_wastewater-sludge_group*” (Bacteroidota) foi crescente devido ao metabolismo versátil e resistência à compostos recalcitrantes e tóxicos no RLF alimentado com esgoto sanitário.

7 Respostas às hipóteses

Hipótese 1: Diferentes concentrações de nitrato e etanol influenciam na remoção dos fármacos em reatores em batelada e contínuo de leito fluidificado.

- **A hipótese 1 foi confirmada**, sendo o nitrato e etanol significativos para a máxima remoção do diclofenaco e ibuprofeno, observando-se maior eficiência de DCF a partir de $180,5 \pm 8,2 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $80,0 \pm 2,6 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$ e $183,5 \pm 28,7 \text{ mgEtOH L}^{-1}$ e de IBU na condição $100,9 \pm 0,1 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$; $104,2 \pm 2,4 \text{ } \mu\text{gIBU L}^{-1}$; $110,6 \pm 15,6 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. Com base nos DCCR avaliados, observou-se que diferentes faixas de concentrações dessas variáveis contribuíram para diferentes respostas de remoção dos fármacos.

Hipótese 2: Alterações no TDH do reator de leito fluidificado podem influenciar a remoção da matéria orgânica, DCF e IBU.

- **A hipótese 2 foi confirmada**. A diminuição do TDH de $18 \pm 2 \text{ h}$ para $12 \pm 1 \text{ h}$ não influenciou na desnitrificação, mas causou redução da eficiência de remoção dos fármacos, do consumo de etanol e da remoção de matéria orgânica.

Hipótese 3: O nitrato adicionado ao reator RLF pode favorecer as populações desnitrificantes e melhorar a remoção do DCF e IBU.

- **A hipótese 3 foi refutada**. Na ausência do nitrato, o metabolismo predominantemente acidogênico foi observado no RLF. Esta alteração metabólica, de desnitrificação heterotrófica para acidogênese, resultou no aumento da eficiência de remoção de matéria orgânica ($56,3 \pm 7,9\%$), DCF ($52,9 \pm 11,4\%$), IBU ($55,8 \pm 11,4\%$) e etanol ($99,7 \pm 1,2\%$), em relação as demais fases, como por exemplo a Fase III, com $37,0 \pm 8,8\%$, $35,2 \pm 19\%$, $39,6 \pm 2,4\%$, respectivamente.

Hipótese 4: A maior remoção de DCF e IBU ocorre em condições de desnitrificação via remoção do nitrato.







- **A hipótese 4 foi parcialmente atendida**. Nos reatores em bateladas, a máxima remoção do DCF foi obtida com $23,6 \pm 9,3\%$ nas condições desnitrificantes a partir de $73,3 \pm 3,6 \text{ } \mu\text{gDCF L}^{-1}$; $180,5 \pm 8,2 \text{ mgNO}_3 \text{ L}^{-1}$; $183,5 \pm 28,7 \text{ mgEtOH L}^{-1}$. Para os ensaios com IBU, obteve-se maior remoção deste fármaco

(97,5±3,1%) a partir de 100,9±0,1 mgNO₃ L⁻¹; 104,2±2,4 µgIBU L⁻¹; 110,6±15,6 mgEtOH L⁻¹. No entanto, no RLF, a maior remoção do DCF e IBU ocorreu na fase predominantemente acidogênica, sem nitrato afluente (Fase IV). Dessa forma, tal hipótese foi atendida nos reatores em bateladas, porém refutada no reator contínuo de leito fluidificado.

Hipótese 5: Ocorre alteração das populações de bactérias dos reatores em batelada e fluidificado em função das condições nutricionais.

- **A hipótese 5 foi confirmada.** Nos reatores em bateladas, foi possível evidenciar que as abundâncias relativas dos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Acinetobacter* aumentaram nas condições com diclofenaco, ibuprofeno, etanol e nitrato, indicando sua prevalência sob condições desnitrificantes com o co-substrato orgânico e com os fármacos. Para o RLF, nas fases com nitrato (Fase I, II e III), observou-se a prevalência de gêneros desnitrificantes: *Acinetobacter*, *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Dechloromonas* e *Desulfovibrio*; enquanto na Fase IV, sem nitrato, houve o predomínio de bactérias acidogênicas Geobacteraceae, Spirochaetaceae, “*Blvii28_wastewater-sludge_group*”, *Desulfomicrobium* e *Fervidobacterium*.

Tabela 5.24. Descrição das hipóteses, resultados obtidos e conclusões

Reator	Hipótese	Descrição	Resultado	Conclusão da hipótese
Bateladas	Hipótese I	Diferentes concentrações de nitrato e etanol influenciam na remoção dos fármacos em reatores em batelada.	Nos ensaios DCCR observou-se que as variações das faixas de concentração de nitrato, diclofenaco, ibuprofeno e etanol contribuíram para diferentes remoções dos fármacos como variáveis respostas.	
	Hipótese III	A maior remoção de DCF e IBU ocorre em condições de desnitrificação via remoção do nitrato.	Nas condições do DCCR, observou-se que as máximas remoções dos fármacos ocorreram em condições desnitrificantes	
	Hipótese V	Ocorre alteração das populações de bactérias dos reatores em batelada.	Bactérias pertencentes aos gêneros <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobulbus</i> , <i>Acinetobacter</i> aumentaram nas condições com diclofenaco, ibuprofeno, etanol e nitrato.	
RLF	Hipótese I	Diferentes concentrações de nitrato e etanol influenciam na remoção dos fármacos no reator contínuo de leito fluidificado	Na Fase IV, sem nitrato, obteve-se remoção de DCF e IBU de 1,8 vezes superior em relação às Fases II e III com $89 \pm 14 \text{ mgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e $100 \pm 10 \text{ mgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente.	
	Hipótese II	Alterações no TDH do reator de leito fluidificado podem influenciar a remoção da matéria orgânica, DCF e IBU.	A diminuição do TDH de $18 \pm 2\text{h}$ para $12 \pm 1\text{h}$ causou diminuição da eficiência de remoção dos fármacos, do consumo de etanol e da remoção de matéria orgânica	
	Hipótese III	O nitrato adicionado ao reator RLF pode favorecer as populações desnitrificantes e melhorar a remoção do DCF e IBU.	Embora os fármacos tenham sido removidos em condições desnitrificantes, a máxima remoção foi obtida em condições acidogênicas.	

8 Conclusões

- O nitrato foi completamente removido em todas as condições avaliadas dos reatores em batelada via DCCR.
- Nos reatores em batelada conduzidos conforme o DCCR para remoção do DCF, concluiu-se que o nitrato (efeito linear e quadrático negativo) representou a maior magnitude de impacto na remoção de diclofenaco, seguida pela concentração de etanol (efeito linear e quadrático positivo).
- A maior magnitude de impacto da remoção de ibuprofeno foi observada nas condições com nitrato (efeito quadrático positivo), seguida pela concentração de ibuprofeno (efeito quadrático negativo) e concentração de etanol (efeito quadrático positivo).
- A remoção máxima de diclofenaco e ibuprofeno ocorreu simultaneamente na fase de operação do RLF com etanol e sem adição de nitrato afluyente;
- A diminuição do TDH de 18 ± 2 h para 12 ± 1 h não influenciou na desnitrificação, mas causou redução da eficiência de remoção dos fármacos, do consumo de etanol e da remoção de matéria orgânica.
- O uso do etanol favoreceu a remoção dos fármacos por meio do cometabolismo;
- As bactérias desnitrificantes pertencentes aos gêneros *Rhodanobacter*, *Haliangium*, *Terrimonas* e *Sorangium* foram identificados em maior abundância relativa em condições de maior remoção de DCF e IBU, sendo que estes gêneros são relacionados ao ciclo do nitrogênio e degradação destes fármacos.

9 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a influência de outros co-substrato orgânicos, como fumarato e metanol na remoção de DCF e IBU sob condições desnitrificantes;
- Aplicação de design fatorial combinado com os fármacos DCF e IBU em relação às variáveis nitrato e etanol;
- Avaliar outros micropoluentes orgânicos em esgoto sanitário e a degradação desses compostos sob condições desnitrificantes e acidogênicas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A, G.; MM, V. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disrupt the heat shock response in rainbow trout. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 81, n. 2, p. 197–206, 28 fev. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17210191/>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

Abu Hasan, H., Sheikh Abdullah, S.R., Al-Attabi, A.W.N., Nash, D.A.H., Anuar, N., Abd. Rahman, N., Sulistiyaning Titah, H., 2016. Removal of ibuprofen, ketoprofen, COD and nitrogen compounds from pharmaceutical wastewater using aerobic suspension-sequencing batch reactor (ASSBR). *Sep. Purif. Technol.* 157, 215–221. doi:10.1016/J.SEPPUR.2015.11.017

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A. (2014) Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). *AJAC* 5, 406–414

ADRADOS, B.; SANCHÉZ, O.; ARIAS, C. A.; BECARES, E.; GARRIDO, L.; MAS, J.; BRIX, H.; MORATÓ, J. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. *Water Research*, v.55, p.304-312, 2014

Aguilar-Romero, I.; Romero, E.; Wittich R.M.; Dillewijn P. Bacterial ecotoxicity and shifts in bacterial communities associated with the removal of ibuprofen, diclofenac and triclosan in biopurification systems. *Science of The Total Environment*, v. 741, p. 140461, 1 nov. 2020.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V.; DELVALLS, A. T.; LAURA MARTÍN-DÍAZ, M. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 142–154, 1 out. 2015.

AHMED, M. B. et al. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 274–298, 5 fev. 2017.

AISSAOUI, S. et al. Metabolic and Co-Metabolic Transformation of Diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 Isolated from Activated Sludge. **Current Microbiology** **2017** **74:3**, v. 74, n. 3, p. 381–388, 7 fev. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-016-1190-x>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

AL-RAJAB, A. J. et al. Investigation of the presence of pharmaceuticals and personal care products (Ppcps) in groundwater of Jazan area, Saudi Arabia. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 10, p. 2061–2066, 1 out. 2018.

ALVARINO, T. et al. A new decentralized biological treatment process based on activated carbon targeting organic micropollutant removal from hospital wastewaters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 2, p. 1214–1223, 1 jan. 2020.

ALVARINO, T. et al. A UASB reactor coupled to a hybrid aerobic MBR as innovative plant configuration to enhance the removal of organic micropollutants. **Chemosphere**, v. 144, p. 452–458, 1 fev. 2016.

AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. et al. Ocorrência de diclofenaco e naproxeno em água superficial no município de Três Lagoas (MS) e a influência da temperatura da água na detecção desses anti-inflamatórios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 3, p. 429–435, 1 maio 2017.

AMIN, N. U. et al. Accumulation of heavy metals in edible parts of vegetables irrigated with waste water and their daily intake to adults and children, District Mardan, Pakistan. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3–4, p. 1515–1523, 15 fev. 2013.

ANDERSEN, H. R. et al. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. **Chemosphere**, v. 61, n. 1, p. 139–146, 2005.

ANDRADE, M. V. F. et al. Bioremoval of Surfactant from Laundry Wastewater in Optimized Condition by Anoxic Reactors. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 4, p. 165, 5 abr. 2017.

ANDRADE, M. V. F. et al. Dynamics and response of microbial diversity to nutritional conditions in denitrifying bioreactor for linear alkylbenzene sulfonate removal. **Journal of Environmental Management**, v. 263, p. 110387, 1 jun. 2020a.

ANDRADE, M. V. F. et al. Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 246–254, 1 jan. 2017a.

Andrade, M.V.F., Delforno, T.P., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020. Dynamics and response of microbial diversity to nutritional conditions in denitrifying bioreactor for linear alkylbenzene sulfonate removal. *J. Environ. Manage.* 263, 110387. doi:10.1016/j.jenvman.2020.110387

Andrade, M.V.F., Sakamoto, I.K., Corbi, J.J., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2017a. Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors. *Bioresour. Technol.* 224, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.001>

Andrade, M.V.F., Sakamoto, I.K., de Oliveira Paranhos, A.G., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2017. Bioremoval of Surfactant from Laundry Wastewater in Optimized Condition by Anoxic Reactors. *Water, Air, Soil Pollut.* 2017 2284 228, 1–13. doi:10.1007/S11270-017-3293-9

APHA, AWWA and WPCF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Eaton, A.D; Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. (Eds.). 19th Edition American Public Health. Washington DC. 21 th edition, 2012.

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, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/esa/a/DV5v33YwS6jFK4mw99WkTsc/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

ARIAS, A. et al. An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient macro and micropollutant removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, p. 113–120, 5 out. 2018.

Arias, A., Alvarino, T., Allegue, T., Suárez, S., Garrido, J.M., Omil, F., 2018. An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient macro and micropollutant removal. *J. Hazard. Mater.* 359, 113–120.

doi:10.1016/j.jhazmat.2018.07.042

ASHFAQ, M. et al. Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 31–39, 1 fev. 2017.

AUS DER BEEK, T. et al. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 823–835, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.3339>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation: An Eco-friendly Sustainable Technology for Environmental Management. In: **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**. [s.l.] Springer Singapore, 2020. p. 19–39.

B, K.; I, M.-M. Influence of Diclofenac on Activated Sludge Bacterial Communities in Fed-Batch Reactors. **Food technology and biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 402–410, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33505203/>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K.S., Subedi, B., 2017. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi:10.1016/j.ecoenv.2016.11.014

BARRIOS-ESTRADA, C. et al. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation - A review. **The Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1516–1531, 15 jan. 2018.

BASHEER, A. A. New generation nano-adsorbents for the removal of emerging contaminants in water. **Journal of Molecular Liquids**, v. 261, p. 583–593, 1 jul. 2018.

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, 15 set. 2011.

BELLVER-DOMINGO, A.; FUENTES, R.; HERNÁNDEZ-SANCHO, F. Shadow prices of emerging pollutants in wastewater treatment plants: Quantification of environmental

externalities. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 439–447, 1 dez. 2017.

BELO, A.; QUINÁIA, S. P.; PLETSCHE, A. L. Assessment of contamination of metals in sediment surface of the beaches from the itaipu lake. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 613–617, 2010.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Disponível em: <<https://www.springer.com/series/4157>>. Acesso em: 3 jun. 2021.

BERNARDELLI, J. K. B. et al. Bacterial Community Structure Applied to Hormone Degradation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 145, n. 12, p. 04019086, dez. 2019.

BESSA, V. S. et al. Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 120, p. 135–142, 1 maio 2017.

BEZSENYI, A. et al. The effect of combined cometabolism and gamma irradiation treatment on the biodegradability of diclofenac and sulfamethoxazole. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 170, 1 maio 2020.

BHANDARI, K.; VENABLES, B. Ibuprofen bioconcentration and prostaglandin E2 levels in the bluntnose minnow *Pimephales notatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 251–257, 1 mar. 2011.

BICKLEY, L. K. et al. Bioavailability and Kidney Responses to Diclofenac in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 1764–1774, 7 fev. 2017.

BIEL-MAESO, M. et al. Mobility of contaminants of emerging concern in soil column experiments. **Science of the Total Environment**, v. 762, p. 144102, 25 mar. 2021.

Biel-Maeso, M., González-González, C., Lara-Martín, P.A., Corada-Fernández, C., 2019. Sorption and degradation of contaminants of emerging concern in soils under aerobic and anaerobic conditions. *Sci. Total Environ.* 666, 662–671. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.279

BOON, N. et al. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-

degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2906–2913, jul. 2000. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aem>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

BORGES, R. M. et al. Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 4, p. 709–720, 2016.

BOUJU, H. et al. Elucidation of biotransformation of diclofenac and 4'hydroxydiclofenac during biological wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, p. 443–452, 2016.

Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sørensen, B., Tolls, J., 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es032519b>

Braga, J. K., Motteran, F., Macedo, T. Z., Sakamoto, I. K., Delforno, T. P., Okada, D. Y., Silva, E. L., & Varesche, M.B. (2015). Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in commercial laundry wastewater by an anaerobic fluidized bed reactor. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 50, 946–957.

BRAGANÇA, I. et al. Cometabolic Degradation of Anti-Inflammatory and Analgesic Pharmaceuticals by a Pentane Enrichment Culture. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 7, 1 jul. 2016.

Bragança, I., Danko, A.S., Pacheco, J., Frascari, D., Delerue-Matos, C., Domingues, V.F., 2016. Cometabolic Degradation of Anti-Inflammatory and Analgesic Pharmaceuticals by a Pentane Enrichment Culture. *Water. Air. Soil Pollut.* 227. doi:10.1007/S11270-016-2933-9

BRANDT, B. W.; VAN LEEUWEN, I. M.; KOUIJMAN, S.A. A general model for multiple substrate biodegradation. Application to co-metabolism of structurally non-analogous compounds. *Water research*, v.37, n.20,p.4843-4854, 2003.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (2005) *Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Verlag, Nova York.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria*, 2nd ed. Michigan, USA.

BUTA, M. et al. Sewage sludge in agriculture – the effects of selected chemical pollutants and emerging genetic resistance determinants on the quality of soil and crops – a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, p. 112070, 1 maio 2021.

BUTKOVSKYI, A. et al. Fate of pharmaceuticals in full-scale source separated sanitation system. **Water Research**, v. 85, p. 384–392, 15 nov. 2015.

BUTKOVSKYI, A. et al. Micropollutant removal from black water and grey water sludge in a UASB-GAC reactor. **Water Science and Technology**, v. 77, n. 4, p. 1137–1148, 1 fev. 2018.

BUTKOVSKYI, A. et al. Mitigation of micropollutants for black water application in agriculture via composting of anaerobic sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 303, p. 41–47, 13 fev. 2016.

C, J. et al. Impact of selected non-steroidal anti-inflammatory pharmaceuticals on microbial community assembly and activity in sequencing batch reactors. **PloS one**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28640897/>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

CALDERÓN-PRECIADO, D.; MATAMOROS, V.; BAYONA, J. M. Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. **Science of the Total Environment**, v. 412–413, p. 14–19, 15 dez. 2011.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nature methods*. 2016;13:581–3.

Callahan BJ, Sankaran K, Fukuyama JA, McMurdie PJ, Holmes SP. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000Research*. 2016;5:1492.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat.*

Methods 2016 137 13, 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869

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, 16 maio 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3929-x>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

CAO, J. et al. Pseudopedobacter beijingensis gen. nov., sp. nov., isolated from coking wastewater activated sludge, and reclassification of Pedobacter saltans as Pseudopedobacter saltans comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 6, p. 1853–1858, 1 jun. 2014. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.053991-0>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

Caporaso, J. Gregory, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.Supplement 1 (2011): 4516-4522.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4516–4522. doi:10.1073/PNAS.1000080107

CARMONA, E.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 484, n. 1, p. 53–63, 15 jun. 2014.

CARRARA, C. et al. Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic system plumes, Ontario, Canada. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 8, p. 2805–2811, 15 abr. 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

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, p.

77–86, 1 fev. 2018.

CHAKRABORTY, R. et al. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8649–8655, dez. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16332859/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C.L., Hassell, D.G., 2009. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chem. Eng. J.* doi:10.1016/j.cej.2009.06.041

CHANG, Y. T. et al. The treatment of PPCP-containing sewage in an anoxic/aerobic reactor coupled with a novel design of solid plain graphite-plates microbial fuel cell. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

Chang, Y.T., Yang, C.W., Chang, Y.J., Chang, T.C., Wei, D.J., 2014. The treatment of PPCP-containing sewage in an anoxic/aerobic reactor coupled with a novel design of solid plain graphite-plates microbial fuel cell. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/765652

Chen, G., Huang, J., Fang, Y., Zhao, Y., Tian, X., Jin, Y., Zhao, H., 2019. Microbial community succession and pollutants removal of a novel carriers enhanced duckweed treatment system for rural wastewater in Dianchi Lake basin. *Bioresour. Technol.* 276, 8–17. doi:10.1016/j.biortech.2018.12.102

CHEN, L. et al. Degradation of diclofenac by *B. subtilis* through a cytochrome P450-dependent pathway. **Environmental Technology and Innovation**, v. 20, p. 101160, 2020a.

CHEN, Q. et al. Review on microaeration-based anaerobic digestion: State of the art, challenges, and perspectives. **Science of The Total Environment**, v. 710, p. 136388, 25 mar. 2020b.

CHEN, Y. et al. Performance of a full-scale modified anaerobic/anoxic/oxic process: High-throughput sequence analysis of its microbial structures and their community functions. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 225–232, 1 nov. 2016.

CHEN, Y.-L. et al. Identification of *Comamonas testosteroni* as an androgen degrader in sewage. **Scientific Reports** 2016 **6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 13 out. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep35386>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

Chen, Y.-L., Wang, C.-H., Yang, F.-C., Ismail, W., Wang, P.-H., Shih, C.-J., Wu, Y.-C., Chiang, Y.-R., 2016. Identification of *Comamonas testosteroni* as an androgen degrader in sewage. *Sci. Reports* 2016 6:1 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep35386>

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. 113253, 19 nov. 2014. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em: 8 jun. 2021.

CHIFFRE, A. et al. Occurrence of pharmaceuticals in WWTP effluents and their impact in a karstic rural catchment of Eastern France. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 25427–25441, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27696074/>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

CHIRON, S.; DUWIG, C. Biotic nitrosation of diclofenac in a soil aquifer system (Katari watershed, Bolivia). **Science of The Total Environment**, v. 565, p. 473–480, 15 set. 2016.

CLEUVERS, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 3, p. 309–315, 1 nov. 2004.

COMBER, S. et al. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: A cause for concern? **The Science of the Total Environment**, v. 613–614, p. 538–547, 1 fev. 2018.

CONTRERAS, C. R. et al. Removal of Organic Micropollutants in Wastewater Treated by Activated Sludge and Constructed Wetlands: A Comparative Study. **Water** 2019, **Vol. 11**, **Page 2515**, v. 11, n. 12, p. 2515, 28 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4441/11/12/2515/htm>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

COOPER, E. R.; SIEWICKI, T. C.; PHILLIPS, K. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. **Science of The Total Environment**, v. 398, n. 1–3, p. 26–33, 15 jul. 2008.

CORTES, L. A.; SIMPSON, J. R.; PARKER, P. A. Response surface split-plot designs: A literature review. **Quality and Reliability Engineering International**, v. 34, n. 7, p. 1374–1389, 2018.

CRUZ-MORATÓ, C. et al. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. **Water Research**, v. 47, n. 14, p. 5200–5210, 5 set. 2013.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; ZIELIŃSKA, M. **Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Springer Netherlands, , 1 abr. 2016. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26931606/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

CZARNY, J. et al. *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 383, p. 121168, 5 fev. 2020.

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, 1 fev. 2018.

Danekar, R., Dixit, S., Prasad, E., 2020. Surfactants market - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020-2027, Allied Market Research. [https://doi.org/10.1016/s1351-4210\(02\)01146-0](https://doi.org/10.1016/s1351-4210(02)01146-0)

Datel, J. V., Hrabankova, A., 2020. Pharmaceuticals Load in the Svihov Water Reservoir (Czech Republic) and Impacts on Quality of Treated Drinking Water. *Water* 2020, Vol. 12, Page 1387 12, 1387. doi:10.3390/W12051387

DE CASTRO, L. V. et al. Behavior of Micropollutants in Polishing Units that Combine Sorption and Biodegradation Mechanisms to Improve the Quality of Activated Sludge

Effluent. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 229, n. 6, 1 jun. 2018.

DE OLIVEIRA, L. L. et al. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5112–5122, 1 jul. 2010.

DE SOUSA, D. N. R. et al. Electrical conductivity and emerging contaminant as markers of surface freshwater contamination by wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 484, n. 1, p. 19–26, 15 jun. 2014.

DE SOUSA, D. N. R. et al. Spatio-temporal evaluation of emerging contaminants and their partitioning along a Brazilian watershed. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 5, p. 4607–4620, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29192401/>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, The second European PhD students workshop: Water and health ? Cannes 2010. v. 214, n. 6, p. 442–448, 1 nov. 2014.

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, 2019.

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. 2017.

Delforno, T. P., Moura, A. G., Okada, D. Y., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. (2015). Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. *Bioresource Technology*, 192, 37–45

Delforno, T.P., Macedo, T.Z., Midoux, C., Lacerda, G. V., Rué, O., Mariadassou, M., Loux, V., Varesche, M.B.A., Bouchez, T., Bize, A., Oliveira, V.M., 2019. Comparative metatranscriptomic analysis of anaerobic digesters treating anionic surfactant contaminated wastewater. *Sci. Total Environ.* 649, 482–494. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.328

DOLFING, J. et al. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. **Archives of Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 336–341, 1 set. 1990.

Dolfing, J., Zeyer, J., Binder-Eicher, P., Schwarzenbach, R.P., 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* 154, 336–341. doi:10.1007/BF00276528

Dornelles, H. de S., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020. 4-Nonylphenol degradation changes microbial community of scale-up Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *J. Environ. Manage.* 267, 110575. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110575>

DRURY, B.; ROSI-MARSHALL, E.; KELLY, J. J. Wastewater treatment effluent reduces the abundance and diversity of benthic bacterial communities in urban and suburban rivers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1897–1905, mar. 2013. Disponível em: <www.census.gov>. Acesso em: 29 jul. 2021.

DU, J. et al. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 1, p. 84–90, 1 jul. 2016.

DUARTE, I. C. S. et al. Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in mesophilic anaerobic sequencing batch reactor. In: **Anais...** World Scientific Pub Co Pte Lt, jan. 2009.

Duarte, I.C.S., L. Oliveira, L., Buzzini, A.P., Adorno, M.A.T., Varesche, M.B.A., 2006. Development of a Method by HPLC to Determine LAS and its Application in Anaerobic Reactors. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 1360–1367. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

DVOŘÁKOVÁ BŘEZINOVÁ, T. et al. Occurrence and removal of ibuprofen and its metabolites in full-scale constructed wetlands treating municipal wastewater. **Ecological Engineering**, v. 120, p. 1–5, 1 set. 2018.

ERICSON, H.; THORSÉN, G.; KUMBLAD, L. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 223–231, 15 ago. 2010.

Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2014.10.021

FALÅS, P. et al. Suspended biofilm carrier and activated sludge removal of acidic pharmaceuticals. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1167–1175, 15 mar. 2012.

FAN, C. H.; YANG, C. W.; CHANG, B. V. Anaerobic degradation of sulfamethoxazole by mixed cultures from swine and sewage sludge. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 40, n. 2, p. 210–218, 15 jan. 2019.

FARIA, E. de et al. Uso de fotorreatores UV para a remoção de diclofenaco, bezafibrato e etinilestradiol de esgoto tratado em sistema UASB-FBP. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 493–502, 1 jul. 2015.

FARRÉ, M. la et al. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 991–1007, 1 dez. 2008.

FATEHIFAR, M.; BORGHEI, S. M.; EKHLASI NIA, A. Application of moving bed biofilm reactor in the removal of pharmaceutical compounds (diclofenac and ibuprofen). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 5530–5535, 1 ago. 2018.

FENG, J. et al. Antibiotic resistome in a large-scale healthy human gut microbiota deciphered by metagenomic and network analyses. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 355–368, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.14009>>.

Acesso em: 23 jul. 2021.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>

FERNÁNDEZ, M. et al. Seasonal occurrence and removal of pharmaceutical products in municipal wastewaters. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 495–502, 1 mar. 2014.

FERRARI, B. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated

wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 3, p. 359–370, 1 jul. 2003.

FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1884–1892, dez. 2005.

FOCAZIO, M. J. et al. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States untreated drinking water sources. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 402, n. 2–3, p. 201–216, 1 set. 2016.

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, 1 out. 2008.

FRÓES, A. M. et al. Distribution and classification of serine β -lactamases in Brazilian hospital sewage and other environmental metagenomes deposited in public databases. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, 15 nov. 2016. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5108929/](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01196). Acesso em: 7 jun. 2021.

Fuchs, G., 2008. Anaerobic metabolism of aromatic compounds, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., pp. 82–99. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.010>

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** **2015 407:15**, v. 407, n. 15, p. 4287–4297, 26 fev. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-015-8540-6>. Acesso em: 8 jul. 2021.

Gallardo-Altamirano, M.J., Maza-Márquez, P., Montemurro, N., Rodelas, B., Osorio, F., Pozo, C., 2019. Linking microbial diversity and population dynamics to the removal efficiency of pharmaceutically active compounds (PhACs) in an anaerobic/anoxic/aerobic (A2O) system. *Chemosphere* **233**, 828–842. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.017>

GAMA-FLORES, J.; SARMA, S.; NANDINI, S. Effect of cadmium level and exposure

time on the competition between zooplankton species *Moina macrocopa* (Cladocera) and *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 41, n. 6, p. 1057–1070, 1 jul. 2006.

GANZENKO, O. et al. Electrochemical advanced oxidation and biological processes for wastewater treatment: a review of the combined approaches. **Environmental Science and Pollution Research** 2014 **21:14**, v. 21, n. 14, p. 8493–8524, 29 mar. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-2770-6>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

GAO, D. W. et al. Sewage treatment by an UAFB-EGSB biosystem with energy recovery and autotrophic nitrogen removal under different temperatures. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 26–31, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25625463/>>. Acesso em: 8 jun. 2021.

GARCÍA-GALÁN, M. J. et al. Multiresidue trace analysis of pharmaceuticals, their human metabolites and transformation products by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 158, p. 330–341, 1 set. 2016.

GARRIDO-CARDENAS, J. A. et al. Wastewater Treatment by Advanced Oxidation Process and Their Worldwide Research Trends. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2020, **Vol. 17, Page 170**, v. 17, n. 1, p. 170, 25 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/17/1/170/htm>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

GAVAZZA DOS SANTOS, S. et al. Comparison of Methanol, Ethanol, and Methane as Electron Donors for Denitrification. **Environmental Engineering Science**, v. 21, n. 3, p. 313–320, 29 jul. 2004. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/109287504323066950>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v.

32, n. 1, p. 147–156, 5 jan. 2015.

Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S.E.A.T.M., Ritsema, C.J., 2015. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *Int. Soil Water Conserv. Res.* 3, 57–65. doi:10.1016/j.iswcr.2015.03.002

Ghattas, A.-K., Fischer, F., Wick, A., Ternes, T.A., 2017. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. *Water Res.* 116, 268–295. doi:10.1016/j.watres.2017.02.001

GHELFI, A. et al. Evaluation of Biochemical, Genetic and Hematological Biomarkers in a Commercial Catfish *Rhamdia quelen* Exposed to Diclofenac. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 2015 96:1, v. 96, n. 1, p. 49–54, 20 nov. 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-015-1693-3>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, et al. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of biotechnology.* 2017;261:169–76.

GONZALEZ-GIL, L. et al. Feeding composition and sludge retention time both affect (co-)metabolic biotransformation of pharmaceutical compounds in activated sludge systems. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, 1 abr. 2021.

Gonzalez-Gil, L., Papa, M., Feretti, D., Ceretti, E., Mazzoleni, G., Steimberg, N., Pedrazzani, R., Bertanza, G., Lema, J.M., Carballa, M., 2016. Is anaerobic digestion effective for the removal of organic micropollutants and biological activities from sewage sludge? *Water Res.* 102, 211–220. doi:10.1016/j.watres.2016.06.025

GONZALEZ-SALGADO, I. et al. Combining thermophilic aerobic reactor (TAR) with mesophilic anaerobic digestion (MAD) improves the degradation of pharmaceutical compounds. **Water Research**, v. 182, 1 set. 2020.

GOPAL, C. M. et al. Seasonal occurrence and risk assessment of pharmaceutical and personal care products in Bengaluru rivers and lakes, India. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105610, 1 ago. 2021.

GOU, J. et al. Effect of carbon to nitrogen ratio on water quality and community structure evolution in suspended growth bioreactors through biofloc technology. **Water (Switzerland)**, v. 11, n. 8, p. 1640, 1 ago. 2019. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/water>. Acesso em: 10 jun. 2021.

GRABICOVA, K. et al. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. **Water Research**, v. 72, p. 145–153, 1 abr. 2015.

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, 2020.

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, 1 mar. 2019.

Granatto, C.F., Grosseli, G.M., Sakamoto, I.K., Fadini, P.S., Varesche, M.B.A., 2020. Methanogenic potential of diclofenac and ibuprofen in sanitary sewage using metabolic cosubstrates. *Sci. Total Environ.* 742, 140530. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140530

Granatto, C.F., Grosseli, G.M., Sakamoto, I.K., Fadini, P.S., Varesche, M.B.A., 2021a. Influence of metabolic cosubstrates on methanogenic potential and degradation of triclosan and propranolol in sanitary sewage. *Environ. Res. J.* 199, 111220. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140530>

Granatto, C.F., Grosseli, G.M., Sakamoto, I.K., Fadini, P.S., Varesche, M.B.A., 2021b. Influence of cosubstrate and hydraulic retention time on the removal of drugs and hygiene products in sanitary sewage in an anaerobic Expanded Granular Sludge Bed reactor. *J. Environ. Manage.* 299. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.113532>

Granatto, C.F., Macedo, T.Z., Gerosa, L.E., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2019. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 138, 23–32. doi:10.1016/j.ibiod.2018.12.010

Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5488–5491

GRÖNER, F. et al. Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 166, p. 473–481, 1 jan. 2017.

GU, Y. et al. C:N ratio shaped both taxonomic and functional structure of microbial communities in livestock and poultry breeding wastewater treatment reactor. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 625–633, 15 fev. 2019.

GUPTA, S. P. et al. A quantitative structure–activity relationship study on a novel class of calcium-entry blockers: 1-[[4-(aminoalkoxy)phenyl]sulphonyl]indolizines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, n. 10, p. 867–873, 2003.

GUSMÃO, V. R. et al. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1391–1400, 1 jun. 2006.

GUSMÃO, V. R. et al. Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. **Journal of Hazardous Materials**, v. 139, n. 2, p. 301–309, 10 jan. 2007.

Gusmão, V., Martins, T. H., Chinalia, F., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A. (2007). BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. *Process Biochemistry*, 41, 1391–1400.

Gusmão, V.R., Chinalia, F.A., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2007. Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. *J. Hazard. Mater.* 139, 301–309. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.06.028

Gusmão, V.R., Chinalia, F.A., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2007. Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. *J. Hazard. Mater.* 139, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.028>

HAAP, T.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70-induction. **Chemosphere**, v. 73, n. 3, p. 353–359, set. 2008.

HAN, S. et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 3, p. 256–264, 1 jul. 2010.

HASHIM, N. et al. Occurrence and Distribution of 17 Targeted Human Pharmaceuticals in Various Aquatic Environmental Matrices in Southeast Asia with Particular Reference to Malaysia: A Comprehensive Review. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 65, n. 3, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.jmcs.org.mx/index.php/jmcs/article/view/1487>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

HE, Y. et al. Pharmaceutical biodegradation under three anaerobic redox conditions evaluated by chemical and toxicological analyses. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 658–664, 15 mar. 2018.

HE, Y. et al. Recovery of biological wastewater treatment system inhibited by oxytetracycline: Rebound of functional bacterial population and the impact of adsorbed oxytetracycline on antibiotic resistance. **Chemical Engineering Journal**, v. 418, p. 129364, 15 ago. 2021.

HEBERER, T.; ADAM, M. Transport and attenuation of pharmaceutical residues during artificial groundwater replenishment. **Environmental Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 22–25, 1 jul. 2004. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/en/EN04008>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

HECKMANN, L. H. et al. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. **Toxicology Letters**, v. 172, n. 3, p. 137–145, 10 ago. 2007.

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, maio 2004a.

Heidelberg, J.F., Seshadri, R., Haveman, S.A., Hemme, C.L., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Eisen, J.A., Ward, N., Methe, B., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Nelson, W.C., Sullivan, S.A., Fouts, D., Haft, D.H., Selengut, J., Peterson, J.D., Davidsen, T.M., Zafar, N., Zhou, L., Radune, D., Dimitrov, G., Hance, M., Tran, K., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T.R., Feldblyum, T. V, Wall, J.D., Voordouw, G., Fraser, C.M., 2004. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nat. Biotechnol.* 22, 554–559. <https://doi.org/10.1038/nbt959>

HELENKÁR, A. et al. The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, n. 2, p. 600–607, 15 jul. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20602942/>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

Hesselsoe, M., Füreder, S., Schloter, M., Bodrossy, L., Iversen, N., Roslev, P., Nielsen, P.H., Wagner, M., Loy, A., 2009. Isotope array analysis of Rhodocyclales uncovers functional redundancy and versatility in an activated sludge. *ISME J.* 3, 1349–1364. doi:10.1038/ismej.2009.78

HIJOSA-VALSERO, M. et al. Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in constructed wetland compartments: Influent, effluent, pore water, substrate and plant roots. **Chemosphere**, v. 145, p. 508–517, 1 fev. 2016.

HONG et al. Study on high efficient pollutant-degradation bacteria for the treatment of wastewater. **Fresenius Environ. Bull.**, 18 (2009), pp. 868-874. 2009.

HOROVÁ, D.; BEZUCHA, P.; RŮŽIČKOVÁ, I. Effect of carbon source and nitrate concentration on denitrification of high-nitrate wastewater. **Environment Protection Engineering**, v. Vol. 46, n. nr 1, 2020.

Hoseinzadeh, E., Rezaee, A., Farzadkia, M., 2018. Nitrate removal from pharmaceutical wastewater using microbial electrochemical system supplied through low frequency-low

voltage alternating electric current. *Bioelectrochemistry* 120, 49–56. doi:10.1016/j.bioelechem.2017.11.008

HOSEINZADEH, E.; REZAEI, A.; HOSSINI, H. Biological nitrogen removal in moving bed biofilm reactor using ibuprofen as carbon source. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 2, p. 227–246, 1 fev. 2016.

HU, B. et al. Employ of arbuscular mycorrhizal fungi for pharmaceuticals ibuprofen and diclofenac removal in mesocosm-scale constructed wetlands. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, 5 maio 2021.

HU, J. et al. Effect of diclofenac on the production of volatile fatty acids from anaerobic fermentation of waste activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 7–15, 1 abr. 2018.

HUBE, S.; WU, B. Mitigation of emerging pollutants and pathogens in decentralized wastewater treatment processes: A review. **Science of The Total Environment**, v. 779, p. 146545, 20 jul. 2021.

HUERTA, B. et al. Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates. **Talanta**, v. 132, p. 373–381, 15 jan. 2015.

HWANG, C. et al. Changes in bacterial community structure correlate with initial operating conditions of a field-scale denitrifying fluidized bed reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2005 71:5, v. 71, n. 5, p. 748–760, 15 nov. 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-005-0189-1>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

Hwang, C., Wu, W.-M., Gentry, T.J., Carley, J., Carroll, S.L., Schadt, C., Watson, D., Jardine, P.M., Zhou, J., Hickey, R.F., Criddle, C.S., Fields, M.W., 2005. Changes in bacterial community structure correlate with initial operating conditions of a field-scale denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005 71:5, 748–760. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0189-1>

ILECHUKWU, I. et al. Occurrence and risk assessment of selected pharmaceuticals in water and sediments of Usuma Dam, Abuja, Nigeria. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1928099>, 2021. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03067319.2021.1928099>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

Ivshina, I.B., Tyumina, E.A., Kuzmina, M. V., Vikhareva, E. V., 2019. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Sci. Rep.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41598-019-45732-9

J, S. et al. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 68, n. 2, p. 141–150, 10 jun. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15145224/>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

JEWELL, K. S. et al. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm–activated sludge processes. **Water Research**, v. 105, p. 559–567, 15 nov. 2016.

JIA, Y. et al. Insights into pharmaceuticals removal in an anaerobic sulfate-reducing bacteria sludge system. **Water Research**, v. 161, p. 191–201, 15 set. 2019.

JIN, D., WANG, P., BAI, Z., JIN, B., YU, Z., WANG, X., ZHUANG, G., ZHANG, H. 2013. *Terrimonas pekingensis* sp. nov., isolated from bulking sludge, and emended descriptions of the genus *Terrimonas*, *Terrimonas ferruginea*, *Terrimonas lutea* and *Terrimonas aquatica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, pp. 1658-1664.

JIN, L. (2013) *Ferruginobacter* sp. Nov and *Caulobacter* sp. Nov Unpublished Submitted Environmental Biotechnology Research.

JURADO, A.; VÁZQUEZ-SUÑÉ, E.; PUJADES, E. Urban groundwater contamination by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Water (Switzerland)**, v. 13, n. 5, 1 mar. 2021.

KAMAL, N. et al. Effect of Glucose Cometabolism on Biodegradation of Gabapentin (an Anticonvulsant Drug) by Gram-Positive Bacteria *Micrococcus luteus* N.ISM.1. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 433–440, 1 jul. 2020.

KAMPMANN, K. et al. Unexpected stability of Bacteroidetes and Firmicutes communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2106–2119, abr. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3302617/>. Acesso em: 21 jun. 2021.

KANFIN, Y. N. et al. The effect of caffeine, metronidazole, and ibuprofen on continuous flow activated sludge process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1370–1380, 1 maio 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.6658>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

Kanafin, Y.N., Kakimov, Y., Adamov, A., Makhatova, A., Yeshmuratov, A., Pouloupoulos, S.G., Inglezakis, V.J., Arkhangelsky, E., 2021. The effect of caffeine, metronidazole, and ibuprofen on continuous flow activated sludge process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 96, 1370–1380. doi:10.1002/jctb.6658

Kang, Y., Zarzycki-Siek, J., Walton, C.B., Norris, M.H., Hoang, T.T., 2010. Multiple FadD Acyl-CoA Synthetases Contribute to Differential Fatty Acid Degradation and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 5, e13557. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0013557

KASONGA, T. K. et al. Assessing a co-culture fungal granule ability to remove pharmaceuticals in a sequencing batch reactor. **Environmental Technology (United Kingdom)**, 2020a.

KASONGA, T. K. et al. Removal of pharmaceutical' estrogenic activity of sequencing batch reactor effluents assessed in the T47D-KBluc reporter gene assay. **Journal of Environmental Management**, v. 240, p. 209–218, 15 jun. 2019.

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, 1 fev. 2009.

KATSOU, E. et al. Effects of selected pharmaceuticals on nitrogen and phosphorus removal bioprocesses. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 509–517, 1 jul. 2016.

KENNES-VEIGA, D. M. et al. The organic loading rate affects organic micropollutants' cometabolic biotransformation kinetics under heterotrophic conditions in activated sludge. **Water Research**, v. 189, 1 fev. 2021.

Kennes-Veiga, D.M., Gonzalez-Gil, L., Carballa, M., Lema, J.M., 2021. The organic

loading rate affects organic micropollutants' cometabolic biotransformation kinetics under heterotrophic conditions in activated sludge. *Water Res.* 189. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2020.116587>

KHAZRI, H. et al. Presence of carbamazepine, naproxen, and ibuprofen in wastewater from northern Tunisia. *Environmental Forensics*, v. 20, n. 2, p. 121–128, 3 abr. 2019.

KIM, S. D. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, v. 41, n. 5, p. 1013–1021, 1 mar. 2007.

KIM, S. J. et al. *Chujaibacter soli* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. *Journal of Microbiology*, v. 53, n. 9, p. 592–597, 28 set. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26310302/>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

KIM, Y. M. et al. Influence of operational parameters on nitrogen removal efficiency and microbial communities in a full-scale activated sludge process. *Water Research*, v. 45, n. 17, p. 5785–5795, 1 nov. 2011.

KIM, Y. M. et al. Influence of operational parameters on nitrogen removal efficiency and microbial communities in a full-scale activated sludge process. *Water Research*, v. 45, n. 17, p. 5785–5795, 1 nov. 2011.

KLEYWEGT, S. et al. The contribution of pharmaceutically active compounds from healthcare facilities to a receiving sewage treatment plant in Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 4, p. 850–862, abr. 2016.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1–e1. doi:10.1093/NAR/GKS808

KONG, Q. et al. Greenhouse gas emission and microbial community dynamics during simultaneous nitrification and denitrification process. *Bioresource Technology*, v. 210, p. 94–100, 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26935325/>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

KONG, Q. et al. Partial nitrification and nitrous oxide emission in an intermittently aerated sequencing batch biofilm reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 217, p. 435–441, 1 fev. 2013.

Kong, Q., Wang, Z. bin, Niu, P. fei, Miao, M. sheng, 2016. Greenhouse gas emission and microbial community dynamics during simultaneous nitrification and denitrification process. *Bioresour. Technol.* 210, 94–100. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.051

Kong, Q., Zhang, J., Miao, M., Tian, L., Guo, N., Liang, S., 2013. Partial nitrification and nitrous oxide emission in an intermittently aerated sequencing batch biofilm reactor. *Chem. Eng. J.* 217, 435–441. doi:10.1016/j.cej.2012.10.093

KOSEK, K. et al. Implementation of advanced micropollutants removal technologies in wastewater treatment plants (WWTPs) - Examples and challenges based on selected EU countries. **Environmental Science & Policy**, v. 112, p. 213–226, 1 out. 2020.

KOSJEK, T. et al. Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole – time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Hydrology**, v. 372, n. 1–4, p. 109–117, 15 jun. 2009.

KOUMAKI, E. et al. Fate of Emerging Contaminants in High-Rate Activated Sludge Systems. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2021, Vol. 18, Page 400, v. 18, n. 2, p. 400, 6 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/18/2/400/htm>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

KOUMAKI, E.; MAMAIS, D.; NOUTSOPOULOS, C. Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 233–241, 5 fev. 2017.

KRALCHEVSKA, R. P. et al. Some endocrine disrupting compounds in the environment and possibilities for their removal / degradation. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 45, n. 2, p. 131–143, 2013.

KRIEG N. R.; LUSWING W.; EUZÉBY J.; WHITMAN W. B.; STALEY J. T.; BROWN D. R.; HEDLUND B. P.; PASTER B. J.; WARD N. L (2010) The Bacteroidetes, Spirohaetes, Termericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria,

Dictyoglomi, Gemmatinomonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiaea, and Planctomycetes. Springer, Nova York.

KRIEG N. R.; LUSWING W.; EUZÉBY J.; WHITMAN W. B.; STALEY J. T.; BROWN D. R.; HEDLUND B. P.; PASTER B. J.; WARD N. L (2010) The Bacteroidetes, Spirohaetes, Termericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatinomonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiaea, and Planctomycetes. Springer, Nova York.

KRUGLOVA, A. et al. Bacterial diversity and population shifts driven by spotlight wastewater micropollutants in low-temperature highly nitrifying activated sludge. **Science of the Total Environment**, v. 605–606, p. 291–299, 15 dez. 2017.

KRUGLOVA, A. et al. Biodegradation of ibuprofen, diclofenac and carbamazepine in nitrifying activated sludge under 12°C temperature conditions. **Science of the Total Environment**, v. 499, n. 1, p. 394–401, 15 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25215408/>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

Krzmarzick, M.J., Crary, B.B., Harding, J.J., Oyerinde, O.O., Leri, A.C., Myneni, S.C.B., Novak, P.J., 2012. Natural Niche for Organohalide-Respiring Chloroflexi. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 393–401. <https://doi.org/10.1128/AEM.06510-11>

KS, J. et al. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm-activated sludge processes. **Water research**, v. 105, p. 559–567, 15 nov. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27690310/>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

KÜSTER, A.; ADLER, N. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, 19 nov. 2014.

KWAK, K. et al. Chronic toxicity and endocrine disruption of naproxen in freshwater waterfleas and fish, and steroidogenic alteration using H295R cell assay. **Chemosphere**, v. 204, p. 156–162, 1 ago. 2018.

LAANE, R. W. P. M. et al. Chemical contaminants in the Wadden Sea: Sources, transport, fate and effects. **Journal of Sea Research**, v. 82, p. 10–53, 1 set. 2013.

Lamichhane, S., Bal Krishna, K.C., Sarukkalige, R., 2017. Surfactant-enhanced remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *J. Environ. Manage.* 199, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.037>

LANGENHOFF, A. et al. **Microbial Removal of the Pharmaceutical Compounds Ibuprofen and Diclofenac from Wastewater**. Research Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/325806/>>.

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.

LARCHER, S.; YARGEAU, V. Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 211–218, jul. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21499763/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

LAWRENCE, J. R. et al. Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 573–582, 1 abr. 2007. Disponível em: <<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1897/06-340R.1>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

LEFEVRE, E. et al. Acetate promotes microbial reductive debromination of tetrabromobisphenol A during the startup phase of anaerobic wastewater sludge bioreactors. **Science of the Total Environment**, v. 656, p. 959–968, 15 mar. 2019.

LEJEUNE, A.; CHOUBERT, J.-M. Modeling of micropollutant removal in full-scale membrane bioreactors: calibration and operations to limit the emissions. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 2019 42:11, v. 42, n. 11, p. 1879–1892, 6 ago. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-019-02183-w>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

LETZEL, M.; METZNER, G.; LETZEL, T. Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 363–368, 1 fev. 2009.

LH, H. et al. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. **Toxicology letters**, v. 172, n. 3, p. 137–145, 10 ago. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17658227/>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

LIANG, C. et al. Dose-dependent effects of acetate on the biodegradation of pharmaceuticals in moving bed biofilm reactors. **Water Research**, v. 159, p. 302–312, 1 ago. 2019.

LIM, M. et al. Removals of micropollutants in staged anaerobic fluidized bed membrane bioreactor for low-strength wastewater treatment. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 127, p. 162–170, 1 jul. 2019.

LIN, A. Y. C. et al. Fate of selected pharmaceuticals and personal care products after secondary wastewater treatment processes in Taiwan. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 10, p. 2450–2458, 2010.

LINDQVIST, N.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. **Water Research**, v. 39, n. 11, p. 2219–2228, 1 jun. 2005.

Liu, T., Lu, S., Wang, R., Xu, S., Qin, P., Gao, Y., 2020. Behavior of selected organophosphate flame retardants (OPFRs) and their influence on rhizospheric microorganisms after short-term exposure in integrated vertical-flow constructed wetlands (IVCWs). *Sci. Total Environ.* 710. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136403

LIU, W. et al. Biological regeneration of manganese (IV) and iron (III) for anaerobic metal oxide-mediated removal of pharmaceuticals from water. **Chemosphere**, v. 208, p. 122–130, 1 out. 2018.

LIU, Y. et al. Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 427–437, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10271-w>>. Acesso em: 20 jun. 2021.

LIU, Y. et al. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of

detoxification-related genes in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 183, p. 104–113, 1 fev. 2017.

Liu, Y., Whitman, W.B., 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>.

LM, G.-O. et al. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. **Drug and chemical toxicology**, v. 37, n. 4, p. 391–399, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24393029/>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

LM, G.-O., M, G.-M., S, G.-M., A, V.-A., H, I.-F., N, N.-C., 2014. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* 37, 391–399. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.870191>

Lodeiro, C., Capelo, J.L., Oliveira, E., Fernández-Lodeiro, A., 2019. Emerging pollutants. II International Caparica conference on pollutant toxic ions and molecules 2nd PTIM-2017. *J. Hazard. Mater.* 370, 1–3. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.02.008

LONAPPAN, L. et al. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. **Environment International**, v. 96, p. 127–138, nov. 2016b.

LONAPPAN, L. et al. Diclofenac in municipal wastewater treatment plant: quantification using laser diode thermal desorption—atmospheric pressure chemical ionization—tandem mass spectrometry approach in comparison with an established liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 106–113, 12 fev. 2016a.

LONDOÑO, Y. A.; PEÑUELA, G. A. Biological Removal of Different Concentrations of Ibuprofen and Methylparaben in a Sequencing Batch Reactor (SBR). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 12, 1 nov. 2015.

LOPES, B. C. et al. Behavior of pharmaceuticals in UV photoreactors fed with sewage treated by anaerobic/aerobic system. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 38, n. 21, p. 2775–2784, 2 nov. 2017.

LÓPEZ-SERNA, R. et al. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 305–315, 1 mar. 2013.

LU, H.; CHANDRAN, K.; STENSEL, D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. **Water Research**, v. 64, p. 237–254, 1 nov. 2014.

LU, M. C. et al. Occurrence and treatment efficiency of pharmaceuticals in landfill leachates. **Waste Management**, v. 55, p. 257–264, 1 set. 2016.

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, 1 mar. 2014.

M, H. et al. A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4421–4430, 1 ago. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12902225/>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

M. Manefield, A.S. Whiteley, R.I. Griffiths, M. Bailey RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11) (2002), pp. 5367-5373

MA, R. et al. Characterization of pharmaceutically active compounds in Beijing, China: Occurrence pattern, spatiotemporal distribution and its environmental implication. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, n. Pt A, p. 147–155, 5 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27236837/>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

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, 1 out. 2015.

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.

Macedo, T.Z., de Souza Dornelles, H., do Valle Marques, A.L., PalladinoDelforno, T., Centurion, V.B., de Oliveira, V.M., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020. 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* 31, 73–89. doi:10.1007/s10532-020-09895-x

Macedo, T.Z., Dornelles, H. de S., Marques, A.L. do V., Delforno, T.P., Centurion, V.B., Oliveira, V.M. de, Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020. 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* 21, 73–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>

MADIKIZELA, L. M.; CHIMUKA, L. Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 7, 1 jul. 2017.

MAILLER, R. et al. Study of a large scale powdered activated carbon pilot: Removals of a wide range of emerging and priority micropollutants from wastewater treatment plant effluents. **Water Research**, v. 72, p. 315–330, 1 abr. 2015.

Maintiguer, S. I., Adorno, M. A. T., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A. (2013). Evaluation of the microbial diversity of the denitrifying bacteria in batch reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30, 457–465

MAKOWSKA, M.; SOWINSKA, A. Characteristics of organic pollutants in wastewater from individual treatment systems. **Desalination and Water Treatment**, v. 206, p. 22–26, 1 dez. 2020.

MARCHLEWICZ, A. et al. *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s.d.]

Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., Wojcieszynska, D., n.d. *Bacillus*

thuringiensis B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. *Water, Air, Soil Pollut.* doi:10.1007/s11270-016-2893-0

MARCO-URREA, E. et al. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 74, n. 6, p. 765–772, 1 fev. 2009.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765–772. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.040

MARTÍNEZ-ALCALÁ, I.; GUILLÉN-NAVARRO, J. M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C. Pharmaceutical biological degradation, sorption and mass balance determination in a conventional activated-sludge wastewater treatment plant from Murcia, Spain. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 332–340, 2017.

MATAMOROS, V.; SALVADÓ, V. Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants. **Chemosphere**, v. 86, n. 2, p. 111–117, 1 jan. 2012.

MATEJCZYK, M. et al. Evaluation of the biological impact of the mixtures of diclofenac with its biodegradation metabolites 4'-hydroxydiclofenac and 5-hydroxydiclofenac on *Escherichia coli*. DCF synergistic effect with caffeic acid. **Archives of Environmental Protection**, v. 46, n. 4, p. 10–22, 2020.

MATEJCZYK, M. et al. The study of biological activity of transformation products of diclofenac and its interaction with chlorogenic acid. **Journal of Environmental Sciences**, v. 91, p. 128–141, 1 maio 2020.

MATOZZO, V.; FRANCHI, N.; BALLARIN, L. In vitro effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, on the immune parameters of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 5, p. 778–783, 1 ago. 2014.

McLaren, M.R., Callahan, B.J., 2021. Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2. doi:10.5281/ZENODO.4587955

MELVIN, S. D.; LEUSCH, F. D. L. Removal of trace organic contaminants from domestic wastewater: A meta-analysis comparison of sewage treatment technologies. **Environment International**, v. 92–93, p. 183–188, 1 jul. 2016.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery**. 5. ed. [s.l: s.n.]

MILAN, M. et al. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 17–29, 15 jan. 2013.

Min, X., Li, W., Wei, Z., Spinney, R., Dionysiou, D.D., Seo, Y., Tang, C.J., Li, Q., Xiao, R., 2018. Sorption and biodegradation of pharmaceuticals in aerobic activated sludge system: A combined experimental and theoretical mechanistic study. *Chem. Eng. J.* 342, 211–219. doi:10.1016/J.CEJ.2018.01.012

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** **2020**, Vol. **10**, Page **3391**, v. 10, n. 10, p. 3391, 14 maio 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/10/10/3391/htm>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/jbchs/a/SCPLQknHcmQGKk78XdKKXpt/?lang=en>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

MONTESDEOCA-ESPONDA, S. et al. Occurrence of pharmaceutical compounds in groundwater from the gran canaria island (Spain). **Water (Switzerland)**, v. 13, n. 3, 1 fev. 2021.

MORASCH, B. Occurrence and dynamics of micropollutants in a karst aquifer. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 133–137, 1 fev. 2013.

MOREAU, M. et al. A baseline assessment of emerging organic contaminants in New

Zealand groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 686, p. 425–439, 10 out. 2019.

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., Nadai, B.M., Braga, J.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. 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. *Sci. Total Environ.* 640–641, 1411–1423. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.375>

MOYA-LLAMAS, M. J.; TRAPOTE, A.; PRATS, D. Removal of micropollutants from urban wastewater using a UASB reactor coupled to a MBR at different organic loading rates. **Urban Water Journal**, v. 15, n. 5, p. 437–444, 28 maio 2018.

Müller, E., Schüssler, W., Horn, H., Lemmer, H., 2013. Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen source. *Chemosphere* 92, 969–978. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.02.070

Munz, M., Oswald, S.E., Schäfferling, R., Lensing, H.J., 2019. Temperature-dependent redox zonation, nitrate removal and attenuation of organic micropollutants during bank filtration. *Water Res.* 162, 225–235. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2019.06.041>

MURDOCH, R. W.; HAY, A. G. Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6121–6125, out. 2005. Disponível em: </pmc/articles/PMC1265923/>. Acesso em: 24 jun. 2021.

MURDOCH, R. W.; HAY, A. G. Genetic and chemical characterization of ibuprofen degradation by *Sphingomonas* Ibu-2. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART3, p. 621–632, 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC4083657/>. Acesso em: 24 jun. 2021.

MURPHY, C. L. et al. Genomic characterization of three novel Desulfobacterota classes expand the metabolic and phylogenetic diversity of the Phylum. **bioRxiv**, p. 2021.03.22.436540, 23 mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436540>>. Acesso em: 3 jun. 2021.

Murphy, C.L., Biggerstaff, J., Eichhorn, A., Ewing, E., Soriano, D., Stewart, S., VanMol, K., Walker, R., Elshahed, M.S., Youssef, N.H., 2021. Genomic characterization of three novel Desulfobacterota classes expand the metabolic and phylogenetic diversity of the Phylum. *bioRxiv* 2021.03.22.436540. <https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436540>

MURSHID, S.; DHAKSHINAMOORTHY, G. P. Biodegradation of Sodium Diclofenac and Mefenamic Acid: Kinetic studies, identification of metabolites and analysis of enzyme activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 144, p. 104756, 1 out. 2019.

NAKADA, N. et al. Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water Research**, v. 40, n. 17, p. 3297–3303, 1 out. 2006.

Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B.C., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, M.T., Pyun, Y.R., 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 178, 538–547. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0489-0>

NANNOU, C. I.; KOSMA, C. I.; ALBANIS, T. A. Occurrence of pharmaceuticals in surface waters: analytical method development and environmental risk assessment. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 95, n. 13, p. 1242–1262, 21 out. 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03067319.2015.1085520>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

NANTABA, F. et al. Occurrence, distribution, and ecotoxicological risk assessment of selected pharmaceutical compounds in water from Lake Victoria, Uganda. **Chemosphere**, v. 239, p. 124642, 1 jan. 2020.

NAVROZIDOU, E.; MELIDIS, P.; NTOUGIAS, S. Biodegradation aspects of ibuprofen

and identification of ibuprofen-degrading microbiota in an immobilized cell bioreactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 14, p. 14238–14249, 12 mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04771-5>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

NAZARET, S.; AMINOV, R. Role and prevalence of antibiotics and the related resistance genes in the environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

NEBOT, C.; GIBB, S. W.; BOYD, K. G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, n. 1, p. 87–94, 15 ago. 2007.

NGUYEN, D.; KHANAL, S. K. A little breath of fresh air into an anaerobic system: How microaeration facilitates anaerobic digestion process. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 7, p. 1971–1983, 15 nov. 2018.

NGUYEN, L. N. et al. Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac on activated sludge microbial communities. **Science of the Total Environment**, v. 657, p. 739–745, 20 mar. 2019.

NIETO, E. et al. Effects of exposure to pharmaceuticals (diclofenac and carbamazepine) spiked sediments in the midge, *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Science of The Total Environment**, v. 609, p. 715–723, 31 dez. 2017.

NIVALA, J. et al. Dynamics of emerging organic contaminant removal in conventional and intensified subsurface flow treatment wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 649, p. 1144–1156, 1 fev. 2019.

NOWROTEK, M. et al. Removal of diclofenac and sulfamethoxazole from synthetic municipal waste water in microcosm downflow constructed wetlands: Start-up results. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n. 2, p. 157–163, 1 fev. 2016.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W., & Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in

paenibacilluspolymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178, 5636–5643.

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. 2013.

Okada, D.Y., Esteves, A.S., Delforno, T.P., Hirasawa, J.S., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2013. Influence of co-substrates in the anaerobic degradation of an anionic surfactant. *Brazilian J. Chem. Eng.* 30, 499–506. doi:10.1590/S0104-66322013000300008

OLIVEIRA, C. A. et al. Removal kinetics of sulfamethazine and its transformation products formed during treatment using a horizontal flow-anaerobic immobilized biomass bioreactor. **Scopus**, v. 365, p. 34–43, 5 mar. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/188319>>. Acesso em: 19 ago. 2021.

Oliveira, L.L., Costa, R.B., Duarte, I.C.S., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2010. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate in fluidized bed reactor. *Brazilian J. Chem. Eng.* 27, 539–543. doi:10.1590/S0104-66322010000400005

OOI, G. T. H. et al. Biological removal of pharmaceuticals from hospital wastewater in a pilot-scale staged moving bed biofilm reactor (MBBR) utilising nitrifying and denitrifying processes. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 677–687, 1 nov. 2018.

OZDEMIR, G. et al. Acute and chronic responses of denitrifying culture to diclofenac. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 112–120, 1 jan. 2015. OZDEMIR, G. et al. Acute and chronic responses of denitrifying culture to diclofenac. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 112–120, 1 jan. 2015.

PADHYE, L. P. et al. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. **Water Research**, v. 51, p. 266–276, 15 mar. 2014.

PAIVA, F. V.; DE SOUZA, N. C.; VAN HAANDEL, A. C. Identification of organic and pharmaceutical compositions in hospital wastewater using a gas chromatograph coupled to mass spectrometry. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 16, n. 1, p. 37–44, 2011.

PAL, A. et al. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environment International**, v. 71, p. 46–62, 1 out. 2014.

PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062–6069, 15 nov. 2010.

PAROLINI, M. et al. An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 5, p. 935–942, 1 ago. 2009.

PAROLINI, M.; BINELLI, A.; PROVINI, A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1586–1594, 1 set. 2011.

PASCOE, D.; KARNTANUT, W.; MÜLLER, C. T. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. **Chemosphere**, v. 51, n. 6, p. 521–528, 1 maio 2003.

PATEL, B. K. C.; MORGAN, H. W.; DANIEL, R. M. *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. **Archives of Microbiology** 1985 141:1, v. 141, n. 1, p. 63–69, 1985. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00446741>>. Acesso em: 5 jun. 2021.

PATEL, N. et al. Emerging Pollutants in Aquatic Environment: Source, Effect, and Challenges in Biomonitoring and Bioremediation- A Review. **Pollution**, v. 6, n. 1, p. 99–113, 1 jan. 2020.

PATROESCU, I. V. et al. Nitrate removal from groundwater by denitrification in fixed and fluidized bed biofilm reactors a comparative study. **Revista de Chimie**, v. 70, n. 1, p. 297–300, 1 jan. 2019.

Pelaz, L., Gómez, A., Letona, A., Garralón, G., Fdz-Polanco, M., 2018. Nitrogen removal

in domestic wastewater. Effect of nitrate recycling and COD/N ratio. *Chemosphere* 212, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.052>

PEÑA-GUZMÁN, C. et al. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. **Journal of Environmental Management**, v. 237, p. 408–423, 1 maio 2019.

PENG, F. J. et al. Occurrence and ecological risk assessment of emerging organic chemicals in urban rivers: Guangzhou as a case study in China. **Science of the Total Environment**, v. 589, p. 46–55, 1 jul. 2017.

PENG, J. et al. Characterizing the removal routes of seven pharmaceuticals in the activated sludge process. **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 2437–2445, 10 fev. 2019.

Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 6137–6145. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.01.067

PEREIRA, C. D. S. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548–549, p. 148–154, 1 abr. 2016.

Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27. doi:10.1016/j.watres.2014.08.053

PHAN, H. V et al. The fate of trace organic contaminants during anaerobic digestion of primary sludge: A pilot scale study. *Water Res.* 72, 3–27. doi:10.1016/j.watres.2014.08.053
The fate of trace organic contaminants during anaerobic digestion of primary sludge: A pilot scale study Recommended Citation Recommended Citation. [s.d.]Disponível em: <<https://ro.uow.edu.au/eispapers1>>1<<https://ro.uow.edu.au/eispapers1/1116>>. Acesso em: 9 ago. 2021.

PHAN, H. V. et al. Simultaneous nitrification/denitrification and trace organic contaminant (TrOC) removal by an anoxic–aerobic membrane bioreactor (MBR). **Bioresource Technology**, v. 165, n. 1, p. 96–104, 1 ago. 2014.

PHILIPPOT, L. **Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes***Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* *Biochim Biophys Acta*, , 27 set. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12359326/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

PHUNG, D. et al. Can wastewater-based epidemiology be used to evaluate the health impact of temperature? – An exploratory study in an Australian population. **Environmental Research**, v. 156, p. 113–119, 1 jul. 2017.

PIVETTA, G. G.; DO CARMO CAUDURO GASTALDINI, M. Presence of emerging contaminants in urban water bodies in southern Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 17, n. 2, p. 329–337, 1 abr. 2019. Disponível em: <<http://iwaponline.com/jwh/article-pdf/17/2/329/846063/jwh0170329.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

PLÓSZ, B. G.; LANGFORD, K. H.; THOMAS, K. V. An activated sludge modeling framework for xenobiotic trace chemicals (ASM-X): Assessment of diclofenac and carbamazepine. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 11, p. 2757–2769, 1 nov. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.24553>>. Acesso em: 21 ago. 2021.

PODDAR, A.; LEPCHA, R. T.; DAS, S. K. Taxonomic study of the genus *Tepidiphilus*: Transfer of *Petrobacter succinatimandens* to the genus *Tepidiphilus* as *Tepidiphilus succinatimandens* comb. nov., emended description of the genus *Tepidiphilus* and description of *Tepidiphilus thermophilus* sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 1, p. 228–235, jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24048864/>>. Acesso em: 10 jun. 2021.

POMIÈS, M. et al. Lab-scale experimental strategy for determining micropollutant partition coefficient and biodegradation constants in activated sludge. **Environmental Science and Pollution Research** 2014 22:6, v. 22, n. 6, p. 4383–4395, 11 out. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3646-5>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

PRASKOVA, E. et al. Effects of subchronic exposure of diclofenac on growth, histopathological changes, and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 645737, 2014.

PULICHARLA, R. et al. Occurrence and seasonality of raw and drinking water contaminants of emerging interest in five water facilities. **Science of The Total Environment**, v. 751, p. 141748, 10 jan. 2021.

QIANG, Z. et al. A comparison of various rural wastewater treatment processes for the removal of endocrine-disrupting chemicals (EDCs). **Chemosphere**, v. 92, n. 8, p. 986–992, 1 ago. 2013.

QIU, X. et al. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. HY2 capable of degrading a high concentration of p-nitrophenol. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5243–5248, 1 nov. 2009.

QUEIROZ, F. B. et al. Determination of endocrine disrupters and pharmaceuticals in sewage samples by tandem solid phase clean up/extraction and high performance liquid chromatography-negative and positive electrospray high-resolution mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 298–312, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130297*>. Acesso em: 2 jul. 2021.

QUEIROZ, F. B. et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 12, p. 2562–2569, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23109571/>>. Acesso em: 2 jul. 2021.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. **Science of The Total Environment**, v. 389, n. 2–3, p. 306–314, 25 jan. 2008.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2019. <https://www.R-project.org/>.

RABUS, R. et al. Anaerobic Initial Reaction of n-Alkanes in a Denitrifying Bacterium: Evidence for (1-Methylpentyl)succinate as Initial Product and for Involvement of an Organic Radical in n-Hexane Metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1707–1715, mar. 2001.

RABUS, R. et al. Anaerobic Initial Reaction of n-Alkanes in a Denitrifying Bacterium: Evidence for (1-Methylpentyl)succinate as Initial Product and for Involvement of an Organic Radical in n-Hexane Metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1707–1715, mar. 2001.

RAGASSI, B. et al. MONITORAMENTO E REMOÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS EM ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO COM LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 53, p. 1–12, 3 fev. 2020. Disponível em: <http://rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/502>. Acesso em: 2 jul. 2021.

REYES CONTRERAS, C. et al. Removal of organic micropollutants in wastewater treated by activated sludge and constructed wetlands: A comparative study. **Water (Switzerland)**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2019.

RIBAS, J. L. C. et al. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 296–303, 2014.

RIOS-MIGUEL, A. B.; JETTEN, M. S. M.; WELTE, C. U. Effect of concentration and hydraulic reaction time on the removal of pharmaceutical compounds in a membrane bioreactor inoculated with activated sludge. **Microbial Biotechnology**, 2021.

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wast 58, 406–411.

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, 2015. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4584990/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)>. Acesso em: 5 jun. 2021.

Roalkvam, I., Drønen, K., Stokke, R., Daae, F.L., Dahle, H., Steen, I.H., 2015. Physiological and genomic characterization of arcobacter anaerophilus IR-1 reveals new metabolic features in epsilonproteobacteria. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00987>

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.

RODRIGUES, K. L. T. et al. Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 242–249, 1 nov. 2014.

RODRIGUEZ-SANCHEZ, A. et al. Maximum Influent Salinity Affects the Diversity of Mineral-Precipitation-Mediating Bacterial Communities in Membrane Biofilm of Hybrid Moving Bed Biofilm Reactor-Membrane Bioreactor. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 229, n. 11, 1 nov. 2018.

ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 578–588, 1 jan. 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, 1 abr. 2013. Disponível em: <<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1890/12-0491.1>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

ROSSMASSLER, K. et al. Impact of primary carbon sources on microbiome shaping and biotransformation of pharmaceuticals and personal care products. **Biodegradation**, v. 30, n. 2–3, p. 127–145, 15 jun. 2019.

RUPPELT, J. P. et al. Assessing the role of microbial communities in the performance of constructed wetlands used to treat combined sewer overflows. **Science of the Total Environment**, v. 736, 20 set. 2020.

S, P.; D, B. First evidence for occurrence of hydroxylated human metabolites of diclofenac and aceclofenac in wastewater using QqLIT-MS and QqTOF-MS. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 21, p. 8135–8145, 1 nov. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18821734/>>. Acesso em: 3 ago. 2021.

Salgado, R., Marques, R., Noronha, J.P., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A.M., 2012. Assessing the removal of pharmaceuticals and personal care products in a full-scale

activated sludge plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1818–1827. doi:10.1007/S11356-011-0693-Z

SALINERO, K. K. et al. Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation. **BMC genomics**, v. 10, p. 351, 3 ago. 2009.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Mol. cloning a Lab. manual.

SANTOS, J. L. et al. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 1509–1516, 30 maio 2009.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 45–95, 15 mar. 2010.

Santos, S. G., Varesche, M. B. A., Zaiat, M., & Foresti, E. (2004). Comparison of methanol, ethanol, and methane as electron donors for denitrification. *Environmental Engineering Science*, 21, 313–320

SARIZADEH, G. et al. Efficiency of hospital wastewater treatment system in removal of level of toxic, microbial, and organic pollutant. **<https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1922923>**, 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15569543.2021.1922923>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

Sarkar, J., Kazy, S.K., Gupta, A., Dutta, A., Mohapatra, B., Roy, A., Bera, P., Mitra, A., Sar, P., 2016. Biostimulation of Indigenous Microbial Community for Bioremediation of Petroleum Refinery Sludge. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01407>

SAUVÊTRE, A. et al. Enrichment of endophytic Actinobacteria in roots and rhizomes of *Miscanthus × giganteus* plants exposed to diclofenac and sulfamethoxazole. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 11, p. 11892–11904, 1 abr.

2020.

SCHAIDER, L. A. et al. Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. **Science of the Total Environment**, v. 468–469, p. 384–393, 15 jan. 2014.

SCHEURELL, M. et al. Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. **Chemosphere**, v. 77, n. 6, p. 870–876, out. 2009.

SCHIMMELPFENNIG, S. et al. Seeking a compromise between pharmaceutical pollution and phosphorus load: Management strategies for Lake Tegel, Berlin. **Water Research**, v. 46, n. 13, p. 4153–4163, 1 set. 2012.

SCHMIDT, N.; PAGE, D.; TIEHM, A. Biodegradation of pharmaceuticals and endocrine disruptors with oxygen, nitrate, manganese (IV), iron (III) and sulfate as electron acceptors. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 203, p. 62–69, 1 ago. 2017.

SCHMIDT, S. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection of diclofenac and related compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1538, p. 112–116, 23 fev. 2018.

Schomburg, I., Jeske, L., Ulbrich, M., Placzek, S., Chang, A., Schomburg, D., 2017. The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system. *J. Biotechnol.* doi:10.1016/j.jbiotec.2017.04.020

SCHWAIGER, J. et al. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 68, n. 2, p. 141–150, 10 jun. 2004.

SERRANO, D. et al. Removal of persistent pharmaceutical micropollutants from sewage by addition of PAC in a sequential membrane bioreactor. **Water Research**, v. 45, n. 16, p. 5323–5333, 2011.

SERRANO, D.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Influence of the employment of adsorption and coprecipitation agents for the removal of PPCPs in conventional activated sludge (CAS) systems. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 3, p. 728–735, 2010.

SHARMA, K. et al. Fate of ibuprofen under optimized batch biodegradation experiments

using *Micrococcus yunnanensis* isolated from pharmaceutical sludge. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 12, p. 8315–8328, 2019.

Sharma, K., Kaushik, G., Thotakura, N., Raza, K., Sharma, N., Nimesh, S., 2019. Fate of ibuprofen under optimized batch biodegradation experiments using *Micrococcus yunnanensis* isolated from pharmaceutical sludge. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16, 8315–8328. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02400-9>

SHEN, J. et al. Enhanced pyridine biodegradation under anoxic condition: The key role of nitrate as the electron acceptor. **Chemical Engineering Journal**, v. 277, p. 140–149, 1 out. 2015.

SHEN, Z.; ZHOU, Y.; WANG, J. Comparison of denitrification performance and microbial diversity using starch/polylactic acid blends and ethanol as electron donor for nitrate removal. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 33–39, 1 mar. 2013.

Shimkets, L. J., Dworkin, M. & Reichenbach, H. (2006). The myxobacteria. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, vol. 7, pp. 31–115. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer

SHOW, S. et al. **Sorptive and microbial riddance of micro-pollutant ibuprofen from contaminated water: A state of the art review** *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 10 set. 2021.

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, 1 jan. 2011.

SIMAZAKI, D. et al. Occurrence of selected pharmaceuticals at drinking water purification plants in Japan and implications for human health. **Water Research**, v. 76, p. 187–200, 1 jun. 2015.

SINGH, V.; SUTHAR, S. Occurrence, seasonal variations, and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products in River Ganges at two holy cities of India. **Chemosphere**, v. 268, p. 129331, 1 abr. 2021.

SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, P.; PAN, I.; CHATTERJEE, S.; CHANDA, P.; BANDYOPADHYAY, D.; DAS, K.; SEN, S. K. Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n.22, p. 2011, 2009. YAO

SNIS. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto – 2014**. [s.l: s.n.].

SOCHACKI, A. et al. Removal and transformations of diclofenac and sulfamethoxazole in a two-stage constructed wetland system. **Ecological Engineering**, v. 122, p. 159–168, 15 out. 2018.

Song, M., Jiang, L., Zhang, D., Luo, C., Wang, Y., Yu, Z., Yin, H., Zhang, G., 2016. Bacteria capable of degrading anthracene, phenanthrene, and fluoranthene as revealed by DNA based stable-isotope probing in a forest soil. *J. Hazard. Mater.* 308, 50–57. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2016.01.009

SPONGBERG, A. L. et al. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6709–6717, 15 dez. 2011.

Stams, A.J.M., 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 271–294. <https://doi.org/10.1007/BF00871644>.

Stams, A.J.M., 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 271–294. <https://doi.org/10.1007/BF00871644>.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 372, p. 17–36, 15 jun. 2019.

STELATO, E. da S. et al. Avaliação da presença de resíduos de anti-inflamatórios não esteroides nos córregos veado e cedro do município de Presidente Prudente (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, v. 39, n. 39, p. 97–113, 31 mar. 2016.

Disponível

em:

<http://rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RB CIAMB/article/view/162>. Acesso em: 4 jul. 2021.

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. 2014a. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.063917-0>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

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. 2014b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24899658/>>. Acesso em: 9 jun. 2021.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. **Water Research**, v. 44, n. 10, p. 3214–3224, maio 2010.

Sun, H., Wang, T., Yang, Z., Yu, C., Wu, W., 2019. Simultaneous removal of nitrogen and pharmaceutical and personal care products from the effluent of waste water treatment plants using aerated solid-phase denitrification system. *Bioresour. Technol.* 287, 121389. doi:10.1016/j.biortech.2019.121389

SUN, Q. et al. PPCPs in Jiulong River estuary (China): Spatiotemporal distributions, fate, and their use as chemical markers of wastewater. **Chemosphere**, v. 150, p. 596–604, 1 maio 2016.

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, 30 jun. 2015.

TAHIR, K. et al. Carbamazepine biodegradation and volatile fatty acids production by selectively enriched sulfate-reducing bacteria and fermentative acidogenic bacteria. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 592–602, 1 mar.

2021.

TAK, S.; TIWARI, A.; VELLANKI, B. P. Identification of emerging contaminants and their transformation products in a moving bed biofilm reactor (MBBR)–based drinking water treatment plant around River Yamuna in India. **Environmental Monitoring and Assessment** 2020 **192:6**, v. 192, n. 6, p. 1–23, 15 maio 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-020-08303-4>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

TANG, K. et al. Impact of intermittent feeding on polishing of micropollutants by moving bed biofilm reactors (MBBR). **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, 5 fev. 2021.

TANG, K. et al. Municipal wastewater treatment targeting pharmaceuticals by a pilot-scale hybrid attached biofilm and activated sludge system (Hybas™). **Chemosphere**, v. 259, 1 nov. 2020.

TANG, K. et al. Removal of pharmaceuticals in conventionally treated wastewater by a polishing moving bed biofilm reactor (MBBR) with intermittent feeding. **Bioresource Technology**, v. 236, p. 77–86, 1 jul. 2017.

Tang, K., Ooi, G.T.H., Torresi, E., Kaarsholm, K.M.S., Hambly, A., Sundmark, K., Lindholm, S., Sund, C., Kragelund, C., Christensson, M., Bester, K., Andersen, H.R., 2020. Municipal wastewater treatment targeting pharmaceuticals by a pilot-scale hybrid attached biofilm and activated sludge system (Hybas™). *Chemosphere* 259. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127397

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., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czejek, M., Michel, G., 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Front. Microbiol.* 2, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>.

THOMAS, K. V. et al. Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 302–308, 1 abr. 2014a. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jawr.12164>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

THOMSEN, T. R.; KONG, Y.; NIELSEN, P. H. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, n. 3, p. 370–382, 1 jun. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article/60/3/370/548322>>. Acesso em: 30 maio. 2021.

TISCA, J. F. et al. Characterization of a fatty acid-binding protein from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): pharmaceutical and toxicological implications. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 22, p. 27811–27822, 1 jun. 2021.

TIWARI, B. et al. Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 1–12, 1 jan. 2017.

Tiwari, B., Sellamuthu, B., Piché-Choquette, S., Drogui, P., Tyagi, R.D., Vaudreuil, M.A., Sauvé, S., Buelna, G., Dubé, R., 2019. The bacterial community structure of submerged membrane bioreactor treating synthetic hospital wastewater. *Bioresour. Technol.* 286, 121362. doi:10.1016/j.biortech.2019.121362

TOGOLA, A.; BUDZINSKI, H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 1, p. 150–158, 4 jan. 2008.

TONG, L. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China. **Science of the Total Environment**, v. 497–498, p. 180–187, 1 nov. 2014.

TORRESI, E. et al. Impact of external carbon dose on the removal of micropollutants using methanol and ethanol in post-denitrifying Moving Bed Biofilm Reactors. **Water Research**, v. 108, p. 95–105, 1 jan. 2017.

TORRESI, E. et al. Removal of micropollutants during biological phosphorus removal: Impact of redox conditions in MBBR. **Science of The Total Environment**, v. 663, p. 496–506, 1 maio 2019.

Torresi, E., Tang, K., Deng, J., Sund, C., Smets, B.F., Christensson, M., Andersen, H.R., 2019. Removal of micropollutants during biological phosphorus removal: Impact of redox conditions in MBBR. *Sci. Total Environ.* 663, 496–506.

doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.01.283

TRAN, N. H.; URASE, T.; KUSAKABE, O. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1–3, p. 1051–1057, 15 nov. 2009.

TRAN, N. H.; URASE, T.; TA, T. T. A Preliminary Study on the Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in Hospital Wastewater and Surface Water in Hanoi, Vietnam. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 42, n. 3, p. 267–275, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/clen.201300021>>. Acesso em: 4 ago. 2021.

UNESCO. **Portal Saneamento Básico – 2019**. [s.l: s.n.].

US EPA, O. **Drinking Water Contaminants – Standards and Regulations**. Collections and Lists. Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwstandardsregulations>>.

V, I.; M, Z.; F, P. Growth, physiological response and phytoremoval capability of two willow clones exposed to ibuprofen under hydroponic culture. **Journal of hazardous materials**, v. 262, p. 796–804, 15 nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140530/>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

VALBONESI, P. et al. Contaminants of emerging concern in drinking water: Quality assessment by combining chemical and biological analysis. **Science of The Total Environment**, v. 758, p. 143624, 1 mar. 2021.

VALDÉS, M. E. et al. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 389–396, 15 fev. 2014.

VERGILI, I. et al. Occurrence and Prioritization of Pharmaceutical Active Compounds in Domestic/Municipal Wastewater Treatment Plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 2, p. 252–258, 15 fev. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-019-02550-z>>. Acesso em: 26 maio. 2021.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. **Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a**

secondary treatment-A review *Science of the Total Environment* Elsevier, , 1 jul. 2012.

VIENO, N.; SILLANPÄÄ, M. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review. *Environment International*, v. 69, p. 28–39, 1 ago. 2014.

VISHNU PRIYAN, V. et al. Ecotoxicological assessment of micropollutant Diclofenac biosorption on magnetic sawdust: Phyto, Microbial and Fish toxicity studies. *Journal of Hazardous Materials*, v. 403, 5 fev. 2021.

VÍTOR CORREIA, J. et al. Brazilian Journal of Development Determinação das condições cromatográficas para a análise de diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno em efluentes Determination of chromatographical conditions for the analysis of diclofenac, ibuprofen and naproxen in effluents. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 6, p. 33624–33629, 3 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/11036>>. Acesso em: 2 jul. 2021.

VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.; WHITMAN, W. (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.

VULLIET, E.; CREN-OLIVÉ, C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 10, p. 2929–2934, 1 out. 2011.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73:5261–7.

Wang, J., Wang, S., 2016. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.049>

WANG, L. et al. Occurrence and risk assessment of acidic pharmaceuticals in the Yellow River, Hai River and Liao River of north China. *Science of The Total Environment*, v.

408, n. 16, p. 3139–3147, 15 jul. 2010.

Wang, Q., Liang, J., Zhang, S., Yoza, B.A., Li, Q.X., Zhan, Y., Ye, H., Zhao, P., Chen, C., 2020. Characteristics of bacterial populations in an industrial scale petrochemical wastewater treatment plant: Composition, function and their association with environmental factors. *Environ. Res.* 189, 109939. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109939>

WELLS, G. F. et al. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 9, p. 2310–2328, 2009.

WEMHEUER, F. et al. Tax4Fun2: prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. *Environmental Microbiome*, v. 15, n. 1, p. 11, dez. 2020.

WEN, Z. H. et al. Occurrence and human health risk of wastewater-derived pharmaceuticals in a drinking water source for Shanghai, East China. *Science of the Total Environment*, v. 490, p. 987–993, 15 ago. 2014.

WERTHER, J.; HARTGE, E. U. Modelling of fluidized bed reactors. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, v. 1, n. 1, 1 nov. 2002.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 259–276, 1 jun. 2001.

WIJAYA, L. et al. Ecotoxicological Effects of Ibuprofen on Plant Growth of *Vigna unguiculata* L. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1473, v. 9, n. 11, p. 1473, 2 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/9/11/1473/htm>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

WILLIAMS, M. et al. Emerging contaminants in a river receiving untreated wastewater from an Indian urban centre. *Science of the Total Environment*, v. 647, p. 1256–1265, 10 jan. 2019.

WOERMANN, M.; SURES, B. Ecotoxicological effects of micropollutant-loaded powdered activated carbon emitted from wastewater treatment plants on *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, v. 746, p. 141104, 1 dez. 2020.

WOLF, L.; ZWIENER, C.; ZEMANN, M. Tracking artificial sweeteners and pharmaceuticals introduced into urban groundwater by leaking sewer networks. **Science of the Total Environment**, v. 430, p. 8–19, 15 jul. 2012.

World Health Organization, 2019. No Title [WWW Document].

Xia, S., Jia, R., Feng, F., Xie, K., Li, H., Jing, D., Xu, X., 2012. Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. *Bioresour. Technol.* 106, 36–43. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.112

XIN, X. et al. Performances of simultaneous enhanced removal of nitrogen and phosphorus via biological aerated filter with biochar as fillers under low dissolved oxygen for digested swine wastewater treatment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 1, p. 3, 1 abr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02557-z>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

XU, H. et al. Effect of anodes decoration with metal and metal oxides nanoparticles on pharmaceutically active compounds removal and power generation in microbial fuel cells. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 539–547, 1 mar. 2018.

Y., G.-B.; ORTIZIRMENE. Biodegradation of Emerging Organic Micropollutants in Nonconventional Biological Wastewater Treatment: A Critical Review. **<https://home.liebertpub.com/ees>**, v. 35, n. 10, p. 1012–1036, 9 out. 2018. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ees.2017.0287>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

Yamamoto, K., Tamaki, H., Cadillo-Quiroz, H., Imachi, H., Kyrpides, N., Woyke, T., Goodwin, L., Zinder, S.H., Kamagata, Y., Liu, W.-T., 2014. Complete genome sequence of *Methanolinea tarda* NOBI-1T, a hydrogenotrophic methanogen isolated from methanogenic digester sludge. *Genome Announc.* 2, 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00876-14>.

YAN, J. et al. Adsorption behavior of diclofenac-containing wastewater on three kinds of sewage sludge. **Water Science and Technology**, v. 80, n. 4, p. 717–726, 15 ago. 2019. Disponível em: <<http://iwaponline.com/wst/article-pdf/80/4/717/621578/wst080040717.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2021.

YAN, J. et al. Use of selected NSAIDs in Guangzhou and other cities in the world as

identified by wastewater analysis. **Chemosphere**, v. 279, p. 130529, 1 set. 2021.

YAN, Z. et al. Screening of high phytotoxicity priority pollutants and their ecological risk assessment in China's surface waters. **Chemosphere**, v. 128, p. 28–35, 1 jun. 2015.

YANG, M. et al. The SBR start-up performing simultaneous removal of organics, nitrogen and phosphorus from aniline wastewater: Pollutant removal efficiency and microbial community succession. **Environmental Pollutants and Bioavailability**, v. 33, n. 1, p. 104–112, 1 jan. 2021.

Yang, M., Ma, F., Xie, Y., Li, L., Xue, Y., 2021. The SBR start-up performing simultaneous removal of organics, nitrogen and phosphorus from aniline wastewater: Pollutant removal efficiency and microbial community succession. *Environ. Pollut. Bioavailab.* 33, 104–112. <https://doi.org/10.1080/26395940.2021.1924079>

YOKOTA, H. et al. Recovery from reproductive and morphological abnormalities in medaka (*Oryzias latipes*) following a 14-day exposure to diclofenac. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 12, p. 3277–3283, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.3899>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

Yoshikawa, M., Zhang, M., Kurisu, F., Toyota, K., 2017. Bacterial Degradors of Coexisting Dichloromethane, Benzene, and Toluene, Identified by Stable-Isotope Probing. *Water. Air. Soil Pollut.* 228. doi:10.1007/S11270-017-3604-1

Yoshikawa, M.; Zhang, M.; Kurisu, F.; Toyota, K. Bacterial degraders of coexisting dichloromethane, benzene, and toluene, identified by stable-isotope probing. *Water Air Soil Pollut.* 2017, 228, 418.

Yoshikawa, M.; Zhang, M.; Kurisu, F.; Toyota, K. Bacterial degraders of coexisting dichloromethane, benzene, and toluene, identified by stable-isotope probing. *Water Air Soil Pollut.* 2017, 228, 418.

Youngseob Y, Changsoo L, Jaai K, Seokhwan H. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng.* 2005;89:670–679.

ZAPATA-MORALES, A. L. et al. Isolation of Cultivable Bacteria Associated with the

Root of *Typha latifolia* in a Constructed Wetland for the Removal of Diclofenac or Naproxen. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 8, 1 ago. 2020.

Zekker, I., Artemchuk, O., Rikmann, E., Ohimai, K., Dhar Bhowmick, G., Madhao Ghangrekar, M., Burlakovs, J., Tenno, T., 2021. Start-Up of Anammox SBR from Non-Specific Inoculum and Process Acceleration Methods by Hydrazine. *Water* 13, 350. doi:10.3390/w13030350

Zekker, I., Bhowmick, G.D., Priks, H., Nath, D., Rikmann, E., Jaagura, M., Tenno, T., Tämm, K., Ghangrekar, M.M., 2020. ANAMMOX-denitrification biomass in microbial fuel cell to enhance the electricity generation and nitrogen removal efficiency. *Biodegradation* 31, 249–264. doi:10.1007/s10532-020-09907-w

Zeyer, J., & Kearney, P. C. (1982). Microbial degradation of parachloroaniline as sole carbon and nitrogen source. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 17, 215–223.

ZHAI, J. et al. Plant uptake of diclofenac in a mesocosm-scale freewater surface constructed wetland by *Cyperus alternifolius*. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 12, p. 3008–3016, 1 jun. 2016.

ZHANG, D. Q. et al. Fate of diclofenac in wetland mesocosms planted with *Scirpus validus*. **Ecological Engineering**, v. 49, p. 59–64, dez. 2012.

Zhang, J., Zheng, J.-W., Hang, B.-J., Ni, Y.-Y., He, J., Li, S.-P., 2010. *Rhodanobacter xiangquanii* sp. nov., a Novel Anilofos-Degrading Bacterium Isolated from a Wastewater Treating System. *Curr. Microbiol.* 2010 622 62, 645–649. doi:10.1007/S00284-010-9757-4

ZHANG, K. et al. Ibuprofen and diclofenac impair the cardiovascular development of zebrafish (*Danio rerio*) at low concentrations. **Environmental Pollution**, v. 258, 1 mar. 2020.

ZHANG, S. et al. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1057–1069, 1 jan. 2007.

ZHANG, Y.; GEISSEN, S. U.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1151–1161, 1 nov. 2008.

ZHAO, J. et al. Diclofenac inhibited the biological phosphorus removal: Performance and mechanism. **Chemosphere**, v. 243, p. 125380, 1 mar. 2020.

Zhao, J., Chen, X., Bao, L., Bao, Z., He, Y., Zhang, Y., Li, J., 2016. Correlation between microbial diversity and toxicity of sludge treating synthetic wastewater containing 4-chlorophenol in sequencing batch reactors. *Chemosphere* 153, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.086>.

ZHAO, Y., JIANG, B., TANG, X., LIU, S. 2019. Metagenomic insights into functional traits variation and coupling effects on the anammox community during reactor start-up. *Science of the Total Environment*, v. 687, pp. 50-60.

ZHOU, G. et al. Chemical composition of extracellular polymeric substances and evolution of microbial community in activated sludge exposed to ibuprofen. **Journal of Environmental Management**, v. 246, p. 267–274, 15 set. 2019.

ZHU, G. et al. The Ecological Risk Assessment of PPCPs Based on Different Endpoints in Urban Rivers from the Pearl River. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 450, n. 1, 23 mar. 2020.

ZHU, S.; CHEN, H.; LI, J. Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan Lake basin, Eastern China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 154–159, 1 out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23871206/>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

ZIYLAN, A.; INCE, N. H. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1–3, p. 24–36, 15 mar. 2011.

ZWIENER, C.; FRIMMEL, F. H. Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. **Science of the Total Environment**, v. 309, n. 1–3, p. 201–211, 20 jun. 2003.