

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**  
**CENTRO DE ENGENHARIA, MODELAGEM E CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**MILENA EMY MATSUBARA**

**REMOÇÃO DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA POR BIORREATOR COM  
MEMBRANA OPERADO EM REGIME DE PRÉ-DESNITRIFICAÇÃO:  
AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, IDENTIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS E  
ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICAS**

**Santo André – SP**

**2018**



MILENA EMY MATSUBARA

**REMOÇÃO DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA POR BIORREATOR COM  
MEMBRANA OPERADO EM REGIME DE PRÉ-DESNITRIFICAÇÃO:  
AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, IDENTIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS E  
ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do ABC, como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientação: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lúcia Helena Gomes Coelho  
Coorientação: Prof. Dr. Eduardo Lucas Subtil

Santo André – SP  
2018

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC  
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Matsubara, Milena Emy

Remoção do antibiótico amoxicilina por biorreator com membrana operado em regime de pré-desnitrificação: avaliação do desempenho, identificação de subprodutos e análises ecotoxicológicas / Milena Emy Matsubara – 2018.

127 fls. : il.

Orientadora: Lúcia Helena Gomes Coelho  
Coorientador: Eduardo Lucas Subtil

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do ABC, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Santo André, 2018.

1. Contaminantes de interesse emergente. 2. Ecotoxicidade. 3. Mecanismos de remoção. 4. Micropoluentes. 5. Produtos de degradação. I. Coelho, Lúcia Helena Gomes. II. Subtil, Eduardo Lucas. III Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, 2018. IV. Título.

**Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.**

Santo André, 03 de JULHO de 2018.

Assinatura do autor: Milena Matubara

Assinatura do orientador: [Assinatura]



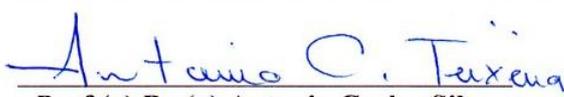


**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental**  
 Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
 CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017  
 pgcta@ufabc.edu.br

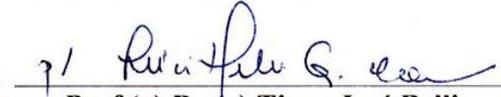
### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No vigésimo dia do mês de abril de dois mil e dezoito, às nove horas, na sala 303, 3º andar do Bloco B, da Universidade Federal do ABC, no campus Santo André, realizou-se a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **“Remoção do antibiótico amoxicilina por biorreatores com membranas submersas (MBRs) de nitrificação e desnitrificação”** de autoria da candidata **Milena Emy Matsubara**, RA nº 131610052, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFABC. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, a candidata foi considerada Aprovada. pela Banca Examinadora.

E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.



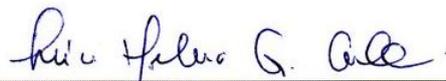
**Prof.(a) Dr.(a) Antonio Carlos Silva  
Costa Teixeira**  
Universidade de São Paulo – Titular



**Prof.(a) Dr.(a) Tiago José Belli**  
Universidade do Estado de Santa Catarina  
– Titular

**Prof.(a) Dr.(a) Rodrigo de Freitas  
Bueno**  
Universidade Federal do ABC – Suplente

**Prof.(a) Dr.(a) Flávio Rubens Lapolli**  
Universidade Federal de Santa Catarina –  
Suplente



**Prof.(a) Dr.(a) Lucia Helena Gomes Coelho**  
Universidade Federal do ABC – Presidente



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental**  
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017  
pgcta@ufabc.edu.br

**Ressalvas e sugestões da Banca examinadora:**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Conforme Resolução da CPG nº 05, de 26 de abril de 2016, os membros que participaram de modo remoto foram:**

---

---

**Por sugestão da Banca Examinadora, o novo título passa a ser:**

*Remoção do antibiótico amoxicilina por bioreator com membrana operado em regime de pré-desnitrificação: avaliação do desempenho, identificação de subprodutos e análises econômicas*



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental**  
 Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
 CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017  
 pgcta@ufabc.edu.br

### FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Milena Emy Matsubara, realizada em 20 de abril de 2018:

*Lucia Helena G. Coelho*

Prof.(a) Dr.(a) **Lucia Helena Gomes Coelho** (Universidade Federal do ABC) – Presidente

*Antonio C. Teixeira*

Prof.(a) Dr.(a) **Antonio Carlos Silva Costa Teixeira** (Universidade de São Paulo) – Membro Titular

*Tiago José Belli*

Prof.(a) Dr.(a) **Tiago José Belli** (Universidade do Estado de Santa Catarina) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Rodrigo de Freitas Bueno** (Universidade Federal do ABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Flávio Rubens Lapolli** (Universidade Federal de Santa Catarina) – Membro Suplente



Dedico ao Yuri e  
aos meus pais, Sueli e Eduardo,  
por todo amor, apoio e compreensão.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do ABC, ao Programa de Pós-Graduação e aos Laboratórios de Análises Ambientais e de Processos Biológicos, pela oportunidade, pelo espaço e equipamentos cedidos para a realização deste trabalho.

À orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Coelho, por toda paciência, carinho, dedicação e orientação, pela confiança, por acreditar no meu potencial, e por me proporcionar o intercâmbio e me permitir realizar o Mestrado Sanduíche na Escócia.

Ao coorientador Prof. Dr. Eduardo Subtil, pela oportunidade, orientação, contribuições, pelo auxílio na montagem do sistema piloto e por extrair o meu melhor para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias Ambientais, por contribuir para minha formação.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Bueno, à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roseli Benassi e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiane Araújo, pelo apoio moral, incentivo e conselhos.

Ao projeto *Water Environmental Micropollutants Scientific Initiative* – WEMSI, pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho junto aos pesquisadores de Glasgow Caledonian University.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro da bolsa de Mestrado Sanduíche.

À Glasgow Caledonian University, pelo espaço e equipamentos para a realização dos experimentos que compõem parte deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Karin Helwig, por me receber muito bem ao grupo, pelo carinho, paciência e orientação, por ser muito solícita e me ajudar em questões relacionadas à pesquisa e à vivência em Glasgow.

Ao Dr. Colin Hunter, pela paciência e orientação, pelos ensinamentos e auxílio nos ensaios laboratoriais.

Ao Zaniel Dantas, pelas contribuições e orientações no desenvolvimento das análises laboratoriais, pela amizade, pelos conselhos e por toda ajuda durante o período que estive em Glasgow.

À Dr<sup>a</sup> Joanne Roberts, pela paciência, pela ajuda e por auxiliar nas análises cromatográficas.

Aos colegas do Laboratório de Análises Ambientais: Abraão Barros, Adriele Moreira, Alyne Flores, Ana Carolina Nogueira, Andreia Morassi, Antônio Mafra, Aristides Cardoso,

Carina Lins, Carollyny Espindola, Cristiane Duarte, Diogo Eiji Kuribayashi, Gilberto Santos, Karen Sato, Karina Frederico, Larissa Fares, Priscila Sanches Rodrigues, Rodrigo de Melo Barbosa, Rodrigo Raggio, Thamiris Bez e todos os alunos que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço toda dedicação, disponibilidade e vontade para ajudar e aprender as análises práticas do laboratório, além de cuidar do reator. Agradeço também a confiança, a oportunidade de conhecer pessoas incríveis e pela amizade que construímos.

Aos amigos Aldrey Alencar, Aline Sanchez, Alvaro Moyano, Anna Morashashi, Bruna Bartmeyer, Bruna Chyoshi, Caroline Miano, Caroline Vaitkevicius, Fernando Almeida, Jamile Gonçalves, Juliana Otomo, Juliana Stopa, Katherine Manara, Lena Reichelt, Leonardo Zanata, Natália Pimenta, Paulo Pires, Raquel Vieira, Regiane Hyodo, Roberlene Gonzales, Vanessa Morita, Victor Falcão e todos que apoiaram e, de alguma forma, me ajudaram a caminhar ao longo desses 26 meses de mestrado. Agradeço a amizade, por compartilhar momentos, histórias, experiências e apertos, pela torcida e por todo apoio.

À minha irmã Mari e cunhado Hideki, pelo amor e carinho, por compreenderem a árdua caminhada até aqui, por todo incentivo e pelo apoio incondicional.

Ao Yuri, minha dupla de mestrado e da vida, meu maior companheiro e meu parceiro. Agradeço por toda ajuda que deu, desde a construção do reator, no laboratório, na viagem e na correria de todos os dias, pelo apoio emocional, pela companhia online noites afora escrevendo o texto, por todo amor e carinho, pela paciência infinita, por acreditar em mim e por estar comigo nessa e em todas as loucuras da vida.

Aos meus pais, Sueli e Eduardo, por sempre apoiarem e incentivarem meus sonhos, pela paciência e por compreenderem a correria, por toda ajuda, amparo, força e apoio psicológico repletos de muito amor e carinho, por fazerem de tudo para que meus dias rendessem além das 24 horas e pela certeza do meu sucesso e de que eu chegaria até aqui. Agradeço por tudo o que fazem e fizeram para eu ser quem sou hoje.

Muito obrigada!

## RESUMO

Os antibióticos têm sido detectados em diversos compartimentos ambientais em concentrações traço da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Mesmo em baixos níveis, compostos farmacologicamente ativos podem afetar a saúde humana e animal. Dentre esses micropoluentes emergentes está a amoxicilina, um antibiótico do tipo penicilina  $\beta$ -lactâmico muito prescrito e consumido ao redor do mundo. Frente aos problemas relacionados com a presença dessa substância no meio ambiente, em várias situações, faz-se necessária sua remoção. O MBR (biorreator com membranas submersas) é um dos sistemas de tratamento com potencial para remover compostos emergentes do efluente. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de um sistema MBR piloto para remover amoxicilina de efluente sintético. Para isto, foi montada uma unidade piloto de dois estágios (tanque anóxico e aeróbio) de fluxo contínuo. A operação do sistema se deu em três fases: (1) com vazão de  $1 \text{ L h}^{-1}$  e TDH de 40 h; (2) adicionando  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina no afluente e (3) alterando a vazão da condição (2) para  $2 \text{ L h}^{-1}$  e TDH de 20 h. A inserção de amoxicilina no afluente não impactou na eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e carbono orgânico dissolvido (COD), nem no processo de nitrificação, mas limitou a desnitrificação possibilitando detectar nitrito nas Fases 2 e 3. A alteração do TDH reduziu a porcentagem de remoção de COD (de 84% para 66% da Fase 2 para Fase 3), mas não influenciou na eficiência de eliminação de DQO (>94%),  $\text{N-NH}_4^+$  (>98%) e N-total (>72%). A remoção de amoxicilina reduziu de 80% para 54% com a mudança da vazão. Os mecanismos de remoção de amoxicilina mediados pela atuação do lodo (adsorção e biodegradação) representam a maior fração removida do antibiótico no MBR (66%), o biofilme atua em 3% e a hidrólise contribui com apenas 2% da remoção. Análises cromatográficas confirmaram a presença de cinco produtos de degradação no afluente do sistema. Foi avaliada a sensibilidade de *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, algas *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata*, sementes de alface (*Lactuca sativa*) e mostarda (*Sinapis alba*) e as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*. Os ensaios de ecotoxicidade mostraram que todos os organismos são influenciados, ao mesmo tempo, pelos efeitos positivos da composição do esgoto sintético como nutrientes e pelos efeitos negativos da ação da amoxicilina. O ensaio de respirometria mostrou que concentrações de 1 a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina não inibiram as bactérias heterotróficas presentes na biomassa do MBR, mas concentrações de 1 a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  as inibem.

**Palavras-chave:** Contaminantes de interesse emergente; Ecotoxicidade; Mecanismos de remoção; Micropoluentes; Produtos de degradação.



## ABSTRACT

Antibiotics have been detected in several environmental compartments at trace concentrations of  $\text{ng L}^{-1}$  and  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Even at low levels, pharmaceutically active compounds can impact human and animal health. Among these emerging micropollutants is amoxicillin, a  $\beta$ -lactamic penicillin antibiotic much prescribed and consumed around the world. Facing the problems related to the presence of this substance in the environment, in several situations, it is necessary to be removed. The MBR (a bioreactor with submerged membranes) is one of the treatment systems with the potential to remove emerging compounds from the effluent. The present work aims to evaluate the efficiency of a MBR system pilot to remove amoxicillin from synthetic wastewater. For this, a continuous flow two-stage (anoxic and aerobic tank) pilot unit was set up. The system operation occurred in three phases: (1) with a flow of  $1 \text{ L h}^{-1}$  and  $\text{HRT} = 40 \text{ h}$ ; (2) adding  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of amoxicillin to the influent and (3) altering the flow rate from condition (2) to  $2 \text{ L h}^{-1}$  and  $\text{HRT} = 20 \text{ h}$ . The addition of amoxicillin in the influent did not affect COD and DOC elimination efficiency nor the nitrification process, but limited denitrification and, thus, nitrite was detected in Phase 2 and 3. The HRT change reduced the COD removal percentage (from 84% to 66 % from Phase 2 to Phase 3), but did not influence COD removal efficiency ( $>94\%$ ),  $\text{N-NH}_4^+$  ( $>98\%$ ) and N-total ( $>72\%$ ). The amoxicillin removal decreased from 80% to 54% with flow rate change. The removal mechanisms of amoxicillin mediated by sludge (adsorption and biodegradation) represent the largest removed fraction of the antibiotic in the MBR (66%), the biofilm acts in 3% and the hydrolysis contributes only 2% of antibiotic removal. Chromatographic analyzes confirmed the presence of five degradation products in the effluent. The sensitivity of *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Chlorella vulgaris* and *Raphidocelis subcapitata* algae, lettuce (*Lactuca sativa*) and mustard (*Sinapis alba*) seed and the bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* were evaluated. Ecotoxicity assays have shown that all organisms are influenced at the same time by the positive effects of the synthetic wastewater composition and by the negative effects of amoxicillin action. The respirometry assay showed that 1 to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of amoxicillin concentrations did not inhibit the heterotrophic bacteria present in MBR biomass, but concentrations between 1 to  $100 \text{ mg L}^{-1}$  inhibit them.

**Keywords:** Degradation products; Ecotoxicity; Emerging contaminants; Micropollutants; Removal mechanisms.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da amoxicilina com destaque para o anel $\beta$ -lactâmico. ....	9
Figura 2 – Configurações do sistema MBR: (A) Biorreator com membranas em módulo externo; (B) Biorreator com membranas submersas. ....	15
Figura 3 - Linha do tempo de execução do projeto. ....	23
Figura 4 – Fluxograma do sistema de biorreatores com membranas. S1: sensor de nível; S2: sensor de pressão; B1 e B2: bombas peristálticas; M: membranas.....	25
Figura 5 – Sistema piloto MBR montado: (A) Tanque de alimentação; (B) Zona anóxica do reator com agitador mecânico e mecanismo de boia; (C) Zona aeróbia do reator com cassete de membranas e difusores; (D) Vacuômetro; (E) Bomba peristáltica; (F) Tanque de permeado. ....	26
Figura 6 – Dimensões do reator MBR utilizado no estudo. ....	27
Figura 7 – Foto do biorreator montado: (Ana) Anaeróbia; (Anx) zona anóxica; (Ae) zona aeróbia. ....	27
Figura 8 – Membrana utilizada na piloto de MBR. ....	28
Figura 9 – Dimensões do cassete de membranas do MBR.....	29
Figura 10 – Foto do cassete de membranas do MBR montado com difusores de ar e membrana: (A) Cassete; (B) Membrana; (C) Difusores de ar. ....	30
Figura 11 – Aclimação do lodo de MBR em efluente sintético. ....	32
Figura 12 – <i>Daphnia magna</i> : (A) Organismo adulto; (B) Organismos neonatos. ....	40
Figura 13 – Analisador de atividade fotossintética. ....	42
Figura 14 – Contador de células. ....	42
Figura 15 – Sementes utilizadas no teste de toxicidade por germinação: (A) Alface; (B) Mostarda. ....	43
Figura 16 – Início do teste de germinação. Sementes dispostas na placa de Petri: (A) Alface; (B) Mostarda. ....	44
Figura 17 - Placas de Petri posicionadas na incubadora.....	44
Figura 18 - Imagem de microplaca de 96 poços.....	46
Figura 19 - Espectrofotômetro para microplacas. ....	46
Figura 20 - Microplaca com amostras, bactérias, solução nutritiva, corante resazurina e ISO water. ....	47
Figura 21 – Curvas de calibração da amoxicilina: (A) Curva baixa; (B) Curva alta. ....	49

Figura 22 – Cromatograma da amoxicilina. (A) Entrada - tempo de retenção: 9,957 min e área: 4578,87 UA; (B) Saída Fase 2 - tempo de retenção: 9,962 min e área: 1504,72 UA; UA = unidades arbitrárias. ....	51
Figura 23 – Espectro de massas de uma amostra do afluente (entrada) contendo amoxicilina. As setas indicam os dois picos de razão massa/carga (m/z) característicos desta substância: m/z = 366 e m/z = 349. ....	51
Figura 24 – Rotas de fragmentação da molécula de amoxicilina em modo de ionização positivo e possíveis produtos gerados, com sua relação massa/carga (m/z). ....	52
Figura 25 – Variação temporal da temperatura no licor misto nas três fases de operação (n = 120 amostragens). ....	54
Figura 26 – Variação temporal da (A) pressão transmembrana (PTM) e (B) permeabilidade a 20 °C nas três fases de operação. As setas indicam os momentos das limpezas na membrana (n = 120 análises). ....	55
Figura 27 – Variação temporal de sólidos suspensos totais (SST) no biorreator durante as três fases monitoradas e análise estatística dos resultados (n = 90 amostragens). ....	57
Figura 28 – Variação temporal do pH nas zonas anóxica e aeróbica do biorreator durante as três fases de operação (n = 120 amostragens). ....	58
Figura 29 – Variação temporal do oxigênio dissolvido (OD) nas zonas anóxica e aeróbica do biorreator nas três fases de operação. ....	58
Figura 30 - Variação temporal da alcalinidade no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 85 amostragens). ....	61
Figura 31 - Variação temporal da turbidez no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 85 amostragens). ....	62
Figura 32 – Demanda química de oxigênio (DQO) no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 90 amostragens). ....	65
Figura 33 – Concentração da série nitrogenada no permeado durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 78 amostragens). ....	68
Figura 34 – Configuração de um sistema MBR para remoção de fósforo: (A) Recirculação; (B) Zona anaeróbia; (C) Zona anóxica; (D) Zona aeróbia; (E) Tanque das membranas; (F) Membranas. ....	71

- Figura 35 – Concentração de amoxicilina no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 52 amostragens). ..... 72
- Figura 36 – Porcentagem de amoxicilina nos diferentes processos de tratamento do MBR.... 74
- Figura 37 – Estrutura química da amoxicilina (AMO) e seus metabólitos ácido amoxicilóico (AMA) e amoxicilina diketopiperazina-2,5-diona (DIKETO). ..... 78
- Figura 38 - Cromatograma da análise dos produtos de degradação da amoxicilina. .... 80
- Figura 39 - Luminescência em amostras das fases 2 e 3 do sistema MBR ao longo do tempo (n = 3 replicatas). ..... 81
- Figura 40 – Porcentagem de inibição da luminescência de *Vibrio fischeri* após 15 e 30 minutos de exposição a amostras do sistema MBR, comparados ao sistema controle de água deionizada (n = 3 replicatas). ..... 81
- Figura 41 – Porcentagem de *Daphnia magna* móveis e nadantes após 48 horas de exposição às amostras do sistema MBR (n = 20 organismos)..... 83
- Figura 42 – Porcentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 48 horas de exposição às amostras do sistema MBR (n = 20 organismos). ..... 84
- Figura 43 – Imagem por microscopia (objetiva 20x) das algas após 24 horas de exposição às amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris* em efluente sintético bruto; (B) *Raphidocelis Subcaptata* em efluente sintético bruto; (C) *Chlorella vulgaris* em permeado da Fase 2; (D) *Raphidocelis Subcaptata* em permeado da Fase 2; (E) *Chlorella vulgaris* em permeado da Fase 3; (F) *Raphidocelis Subcaptata* em permeado da Fase 3. .... 86
- Figura 44 – Imagem das algas após 96 horas de exposição às amostras do sistema MBR. (A) *Chlorella vulgaris* em água deionizada, efluente sintético bruto, permeado da Fase 2 e permeado da Fase 3; (B) *Raphidocelis Subcaptata* em água deionizada, efluente sintético bruto, permeado da Fase 2 e permeado da Fase 3. .... 87
- Figura 45 – Cinética do crescimento das algas em amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris*; (B) *Raphidocelis subcaptata* (n = 4 replicatas). .... 88
- Figura 46 – Concentração de células das algas crescidas (unidades mL<sup>-1</sup>) em 96 horas de exposição às amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris*; (B) *Raphidocelis Subcaptata* (n = 4 replicatas). ..... 89
- Figura 47 – Cinética da atividade fotossintética das algas em amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris*; (B) *Raphidocelis Subcaptata* (n = 4 replicatas). ..... 90
- Figura 48 - Foto das sementes de mostarda (*Sinapis alba*) germinada em água deionizada. .... 92

Figura 49 – Porcentagem de germinação de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) e mostarda ( <i>Sinapis Alba</i> ) em amostras do MBR (n = 30 sementes).....	92
Figura 50 – Comprimento da raiz das sementes germinadas em amostras do sistema MBR (n = 30 sementes). ....	93
Figura 51 – Porcentagem de inibição da raiz das sementes germinadas em amostras do sistema MBR: (A) <i>Lactuca sativa</i> ; (B) <i>Sinapis alba</i> (n = 30 sementes). ....	94
Figura 52 – Crescimento celular das bactérias em ISO water, água deionizada, afluente (entrada) e efluente (saída) do sistema MBR (n = 6 replicatas). ....	96
Figura 53 – Porcentagem de inibição do crescimento celular das bactérias em relação à água deionizada em amostras do sistema MBR (n = 6 replicatas).....	96
Figura 54 – Respiração das bactérias em ISO water, água deionizada, afluente (entrada) e efluente (saída) do sistema MBR.....	98
Figura 55 – Porcentagem de inibição da respiração das bactérias em relação à água deionizada em amostras do sistema MBR. ....	98
Figura 56 – Respirograma das bactérias heterotróficas expostas a diferentes concentrações de amoxicilina. ....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas da amoxicilina. ....	9
Tabela 2 – Concentrações de amoxicilina encontradas em diferentes matrizes ao redor do mundo.....	10
Tabela 3 - Classificação do tipo de filtração por membranas.....	14
Tabela 4 – Remoção de fármacos pelos processos de biodegradação e sorção em sistemas MBR.....	18
Tabela 5 – Características das três fases de operação do sistema MBR.....	24
Tabela 6 – Composição do esgoto sintético utilizado no presente trabalho.....	31
Tabela 8 - Nutrientes adicionados às amostras do ensaio ecotoxicológicos com algas. ....	41
Tabela 9 – Valores obtidos do tempo de detenção hidráulica (TDH), pressão transmembrana (PTM), temperatura, fluxo e permeabilidade a 20 °C nas três fases de operação. (n = 120 amostragens) .....	53
Tabela 10 – Valores obtidos da concentração de sólidos suspensos totais e voláteis e a relação alimento/microrganismo nas três fases de operação (n = 120 amostragens).....	55
Tabela 11 – Valores de pH nas zonas anóxica e aeróbica do biorreator nas três fases de operação (n = 120 amostragens).....	57
Tabela 12 – Valores de oxigênio dissolvido (OD) nas zonas anóxica e aeróbica do biorreator nas três fases de operação (n = 120 amostragens).....	58
Tabela 13 – Valor de pH e concentração de alcalinidade, cor, turbidez e condutividade elétrica do afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases de operação do MBR (n = 90 amostragens).....	60
Tabela 14 – Concentração de DQO e COD do afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases de operação do MBR (n = 90 amostragens).....	63
Tabela 15 – Concentração das frações de nitrogênio no afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases de operação do MBR (n = 80 amostragens).....	66
Tabela 16 – Concentração de fósforo total do afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases analisadas (n = 80 amostragens).....	70
Tabela 17 – Concentração de amoxicilina do afluente (entrada) e efluente (saída) nas duas fases analisadas (n = 52 amostragens).....	71
Tabela 18 – Concentração (em $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de amoxicilina nos diferentes processos de tratamento do sistema MBR (n = 2 replicatas).....	74
Tabela 19 – Produtos de degradação da amoxicilina no afluente (entrada) e efluente (saída) das fases 2 e 3.....	79

Tabela 20 – Efeitos ecotoxicológicos da amoxicilina. Valores positivos indicam estimulação e valores negativos indicam inibição..... 102

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/M	Relação alimento/microrganismo
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
$A_m$	Área de membrana
AMA	Ácido amoxicilóico
AMO	Amoxicilina
ANOVA	Análise de variância
BOA	Bactérias oxidadoras de amônia
BON	Bactérias oxidadoras de nitrito
BRICS	Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul
C	Carbono orgânico
C.V.	Coefficiente de variação
C:N	Relação carbono orgânico/nitrogênio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIRRA	Centro Internacional de Referência em Reúso de Água
COD	Carbono orgânico dissolvido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
D.P.	Desvio padrão
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DDT	Pesticida diclorodifeniltricloroetano
DIKETO	Amoxicilina diketo-piperazina-2,5-diona
DQO	Demanda química de oxigênio
$EC_{50}$	<i>Half maximal effective concentration</i>
ETA	Estação de tratamento de água
ETAR	Estação de tratamento de água para reúso
ETEs	Estações de tratamento de esgotos
$F_{kt}$	Fator de correção
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
$H_t$	Relação entre a luminescência final e inicial
$I_0$	Luminescência inicial
$I_{30}$	Luminescência em 30 minutos
$IC_{50}$	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ICSU	<i>International Council of Scientific Unions</i>
$J_{20^\circ C}$	Fluxo de permeado na temperatura corrigida para 20 °C
$J_T$	Fluxo de permeado na temperatura monitorada
$K_{oc}$	Coefficiente de partição carbono orgânico/ água
LAC	Lodos ativados convencional
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massa
LD	Limite de detecção
LOEC	Lowest observed effect concentration
LQ	Limite de quantificação
MBR	Biorreator com membranas submersas
N	Nitrogênio

N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrogênio amoniacal
N-NKT	Nitrogenio Kjeldahl total
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrogênio na forma de nitrito
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrogênio na forma de nitrato
NOEC	<i>No observed effect concentration</i>
N-Org	Nitrogênio orgânico
N-total	Nitrogênio total
OD	Oxigênio dissolvido
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
P	Permeabilidade
PCBs	Bifenilas policloradas
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação ácida
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PNAUM	Pesquisa Nacional de Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos
PNEC	<i>Predicted no-effect concentration</i>
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PPCPs	<i>Pharmaceuticals and personal care products</i>
PTM	Pressão transmembrana
P-total	Fósforo total
Q	Vazão
RPM	Rotações por minuto
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SANASA	Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A
SCOPE	<i>Scientific Committee on Problems of the Environment</i>
SP	São Paulo
SPE	Extração em fase sólida
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TCO	Taxa de consumo de oxigênio
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRS	Tempo de retenção de sólidos
UFABC	Universidade Federal do ABC
UNT	Unidades nefelométricas de turbidez
URL	Unidades Relativas de Luminescência
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USP	Universidade de São Paulo
V	Volume do reator
X <sub>SST</sub>	Quantidade de sólidos suspensos totais
Δt	Variação do tempo

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	OBJETIVOS .....	3
2.1.	Objetivos específicos .....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1.	Contaminantes de interesse emergente .....	4
3.2.	Amoxicilina .....	8
3.3.	Tratamento de Esgotos.....	11
3.4.	Biorreatores com membranas (MBR).....	13
3.4.1.	Remoção de Nitrogênio por MBR .....	16
3.4.2.	Processos de remoção de fármacos em sistema MBR.....	17
3.5.	Ecotoxicologia .....	19
3.5.1.	Organismos utilizados em ensaios de ecotoxicidade.....	20
3.5.2.	Ensaio de respirometria .....	21
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1	Delineamento experimental .....	23
4.2	Montagem do sistema piloto de biorreatores com membranas submersas (MBR) .....	25
4.3	Preparo do efluente sintético.....	31
4.4	Aclimação, partida e estabilização do sistema de MBR .....	32
4.5.	Monitoramento de parâmetros de controle do sistema MBR .....	33
4.6	Coleta, preparo e caracterização das amostras de afluente e efluente .....	34
4.7	Análise cromatográfica .....	35
4.8	Mecanismos de remoção de amoxicilina pelo MBR .....	36
4.9	Ensaio ecotoxicológico .....	37
4.9.1	Ensaio com <i>Vibrio fischeri</i> .....	38
4.9.2	Ensaio com <i>Daphnia magna</i> .....	40
4.9.3	Ensaio com as algas <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	40
4.9.4	Ensaio com sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) e mostarda ( <i>Sinapis alba</i> ).....	42
4.9.5	Ensaio com as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> ....	45
4.9.6	Influência da amoxicilina nas bactérias heterotróficas pelo método da respirometria .	48
4.10	Análise dos resultados .....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
5.1.	Análises cromatográficas.....	49
5.2.	Condição operacional do MBR.....	52
5.3.	Monitoramento de parâmetros de controle e de qualidade do afluente e efluente .....	59
5.3.1.	Avaliação do pH e remoção da cor, turbidez, alcalinidade e condutividade elétrica ...	59
5.3.2.	Remoção de matéria orgânica.....	63
5.3.3.	Remoção de nitrogênio .....	65

5.3.4. Remoção de fósforo .....	70
5.3.5. Remoção de amoxicilina.....	71
5.4. Mecanismos de remoção da amoxicilina pelo MBR .....	74
5.5. Produtos de degradação .....	77
5.6. Ensaio ecotoxicológico com amostras provenientes do MBR .....	81
5.6.1. <i>Vibrio fischeri</i> .....	81
5.6.2. <i>Daphnia magna</i> .....	83
5.6.3. Algas <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	85
5.6.4. Sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) e mostarda ( <i>Sinapis alba</i> ).....	91
5.6.5. Bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	95
5.6.6. Efeito da amoxicilina nas bactérias heterotrófica .....	99
5.6.7. Visão geral dos efeitos ecotoxicológicos da amoxicilina .....	101
5.6.8. Efeitos ecotoxicológicos da amoxicilina em outros organismos .....	103
6. CONCLUSÃO .....	104
7. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES A FUTUROS TRABALHOS.....	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108

## 1. INTRODUÇÃO

Diferentes substâncias químicas têm sido encontradas em sistemas aquáticos em concentrações inferiores a  $\mu\text{g g}^{-1}$  ou  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a maioria não é eliminada ou biotransformada, podendo ser persistentes, bioativas e bioacumulativas, são chamadas de micropoluentes (DAS *et al.*, 2017). Alguns micropoluentes detectados no meio ambiente são também considerados como poluentes de interesse emergente, pois atualmente não estão cobertos por regulamentações de qualidade da água existentes, não foram estudados anteriormente e são considerados como potenciais ameaças aos ecossistemas ambientais e à saúde e segurança humana (LA FARRÉ *et al.*, 2008; TESTA, 2017).

Dentre os micropoluentes emergentes presentes no meio ambiente estão os fármacos. Um levantamento conduzido por Beek *et al.* (2016) mostrou a ocorrência de 631 substâncias farmacêuticas humanas e veterinárias em diferentes matrizes ambientais de 71 países de todos os continentes, indicando que se trata de uma questão global.

Os fármacos são substâncias fisiologicamente ativas e sua existência no meio ambiente pode provocar efeitos na saúde humana e animal. Como exemplos tem-se a feminização de peixes devido à exposição a baixas concentrações de estrogênio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol (JUKOSKY *et al.*, 2008), o aumento da taxa de sobrevivência de peixes expostos à droga de antiansiedade oxazepam (classe das benzodiazepinas) comparados aos peixes não expostos (MAKIN, 2014). Embora os compostos farmacêuticos se encontrem em baixíssimas concentrações na água, um impacto indireto dos agentes antibióticos pode, por exemplo, causar problemas severos na saúde humana através de genes de resistência a antibióticos (KLATTE; SCHAEFER; HEMPEL, 2017).

Os antibióticos correspondem à maior categoria de fármacos utilizados na medicina humana e veterinária. O uso intensificado desses compostos pode acarretar dois problemas ambientais: (1) decorrente da sua contaminação nos recursos hídricos e (2) associado ao aumento de resistência de alguns microrganismos por esses fármacos. As bactérias, por exemplo, podem promover mudanças em seu material genético, adquirindo resistência a esses fármacos (MICHAEL *et al.*, 2013; HILTUNEN; VIRTA; LAINE, 2016; PIKKEMAAT, 2016).

A infecção de pacientes com essas bactérias resistentes pode resultar em menor eficácia no tratamento terapêutico, pois são doenças que não podem ser tratadas por antibióticos convencionais (CHAYID; AHMED, 2015), promovendo implicações para o gerenciamento de riscos e tornando-o um grave problema de saúde pública (BENGTSSON-PALME, 2015). Stapleton *et al.* (2017) observaram, num período de 10 anos, que as taxas de não suscetibilidade das bactérias *E. coli* à trimetoprima, amoxicilina e gentamicina eram

elevadas e à ciprofloxacina, amoxicilina-ácido clavulânico e piperacilina-tazobactama têm aumentado ao longo do tempo. Estudos epidemiológicos demonstram a relação entre o consumo excessivo de antibióticos, seu uso extensivo e o descarte inadequado, que aumentam a exposição dos microrganismos aos fármacos e promovem o surgimento e disseminação das cepas bacterianas resistentes (NATURE, 2013; VENTOLA, 2015).

A amoxicilina é um antibiótico cuja atuação ocorre destruindo as paredes celulares das bactérias quando estão em processo de reprodução (BAGHAPOUR *et al.*, 2014). A prescrição do uso de amoxicilina ainda é alta devido à sua grande eficácia no combate à maioria das bactérias patogênicas e ao baixo custo e aos poucos efeitos colaterais, sendo utilizada em medicina humana e veterinária (ELIZALDE-VELÁZQUEZ *et al.*, 2016).

Os processos utilizados em sistemas convencionais de tratamento de água não garantem a remoção de uma série de micropoluentes, especialmente os fármacos (JONES *et al.*, 2005). Entretanto, diferentes estudos sobre estratégias de tratamento têm demonstrado eficiência no processo de remoção para um número expressivo de fármacos, como os processos oxidativos avançados e ozonização (SOPAJ *et al.*, 2015), adsorção em carvão ativado (MAILLER *et al.*, 2016), e nanofiltração ou osmose reversa em membranas (AZAIS *et al.*, 2016).

Grandclément *et al.* (2017), por exemplo, fizeram uma revisão sobre a eficiência de remoção de micropoluentes orgânicos de águas residuárias por diferentes processos biológicos (convencionais e híbridos), além de avaliar a influência dos parâmetros físico-químicos e a eficiência de remoção de microrganismos, como bactérias e fungos. Foi observado que conhecer as características dos micropoluentes alvo e otimizar as condições de operação, como pH, aeração, tempo de detenção hidráulica e tempo de retenção de sólidos, são fundamentais para melhorar o processo de tratamento em sistema de biorreatores com membranas.

Assim, a remoção de antibióticos e outros micropoluentes em águas residuárias pode ser assegurada utilizando técnicas mais avançadas, como por exemplo, o sistema de Biorreator com Membranas (MBR, do inglês “*Membrane Biological Reactor*”), sendo amplamente utilizado para produção de água para reúso (SUBTIL; HESPANHOL; MIERZWA, 2013). Sua configuração e combinação com outros processos de tratamento garante uma qualidade de água que atende as diversas finalidades (NRC, 2012). O MBR é um sistema de tratamento avançado que, além de garantir efluente tratado a nível terciário, pode remover compostos emergentes conforme indicam estudos feitos por Kimura *et al.* (2005), Tambosi *et al.* (2010) e Wang *et al.* (2018).

Além das variáveis físico-químicas, a qualidade da água pode ser avaliada através de índices bióticos, pois os organismos biologicamente menos complexos são mais sensíveis às alterações ambientais, como descarga de poluição, aumento de nutrientes, perda de *habitat* e superexploração do meio (BIRK, 2012). Métodos ecotoxicológicos que utilizam bactérias, plânctons, crustáceos e bentos têm se mostrado eficazes para medir a toxicidade compostos presentes em diferentes compartimentos ambientais (água, solo e sedimentos) (PALMA, 2016).

Neste contexto, o presente trabalho pretende contribuir com o desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao tratamento terciário de efluentes a partir do estudo do desempenho de um sistema piloto de biorreatores com membranas na remoção do antibiótico amoxicilina, visando reduzir sua concentração nas águas residuárias tratadas, além de avaliar a ecotoxicidade do efluente tratado de forma diminuir o potencial de resistência microbiana e a exposição a humanos e animais.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar a remoção de antibiótico amoxicilina de esgoto sanitário por processo MBR e a qualidade do efluente tratado em termos de formação de subprodutos e ensaios de ecotoxicidade.

### 2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a influência do antibiótico amoxicilina na remoção de matéria orgânica (DQO e COD) e nitrogênio pelo sistema MBR;
- Avaliar o impacto do tempo de detenção hidráulica (TDH) na remoção do antibiótico amoxicilina;
- Investigar os mecanismos predominantes de remoção do antibiótico amoxicilina no sistema MBR;
- Avaliar o efeito do antibiótico amoxicilina na atividade heterotrófica microbiana do sistema MBR;
- Verificar a ecotoxicidade do efluente tratado por MBR utilizando os organismos-teste: *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Chrorella vulgaris*, *Raphidocelis subcapitata*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Lactuca sativa* e *Sinapis Alba*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Contaminantes de interesse emergente

A questão dos micropoluentes tem sido discutida desde meados da década de 1990, quando a expressão “contaminantes emergentes” foi usada vagamente pelos órgãos ambientais para se referir às novas substâncias presentes em baixas concentrações encontradas nas matrizes ambientais. Atualmente, o termo “contaminante de interesse emergente” tem sido usado para substituir o “contaminante emergente”. De acordo com o “*White Paper Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern: Part I Challenges and Recommendations*”, um documento elaborado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”),

*“Contaminantes de interesse emergente correspondem aos produtos químicos e outras substâncias que ainda não possuem normas regulamentadoras, e que foram recentemente detectados em fluxos naturais (muitas vezes devido aos níveis melhorados de detecção da química analítica) e potencialmente causam efeitos deletérios na vida aquática em concentrações ambientalmente relevantes. São poluentes que não estão inclusos nos programas de monitoramento de rotina e podem ser candidatos a futuras regulamentações, dependendo da sua (eco)toxicidade, efeitos potenciais para a saúde, percepção pública e frequência de ocorrência no meio ambiente. Não são necessariamente produtos químicos novos, mas frequentemente estão no meio ambiente, cuja presença e significado ainda estão sendo avaliados”.*

(USEPA, 2008)

Ainda segundo essas diretrizes de USEPA (2008), tais contaminantes podem ser separados em cinco grupos: poluentes orgânicos persistentes (POPs), fármacos e produtos de higiene pessoal (PPCPs, do inglês “*Pharmaceuticals and personal care products*”), fármacos de uso veterinário, disruptores endócrinos e nanomateriais. Outros autores, no entanto, classificam em: produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs), hormônios esteroides, surfactantes, produtos químicos industriais e pesticidas (LUO *et al.*, 2014).

Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) englobam o conjunto dos produtos utilizados principalmente para prevenir ou tratar doenças humanas e animais, como os medicamentos prescritos (ex.: antidepressivos, para controle de pressão arterial), medicamentos de venda livre (ex.: ibuprofeno) e bactericidas (ex.: amoxicilina, triclosan); e dos produtos de higiene pessoal como hidratantes, batons, xampus, hidratantes, desodorantes e pastas de dente (USEPA, 2008; BOXALL *et al.*, 2012).

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos químicos que possuem propriedades tóxicas, são resistentes à biodegradação, semivoláteis, têm baixa solubilidade em água e se bioacumulam. Exemplos de POPs são os pesticidas DDT, o heptacloro, o toxafeno, as bifenilas policloradas (PCBs), o hexaclorobenzeno, os éteres difenílicos polibromados, os ácidos orgânicos perfluorados, as dioxinas e os furanos (FELIX; NAVICKIENE, DÓREA, 2007).

Segundo Ghiselli e Jardim (2007), disruptores endócrinos são substâncias químicas que, mesmo em concentrações muito baixas, pode interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos. Incluem os estrogênios sintéticos (ex.:  $17\alpha$ -etinilestradiol), estrogênios naturais (ex.: estradiol, testosterona), andrógenos (ex.: trembolona, um medicamento veterinário), pesticidas organoclorados, aditivos plásticos, PCBs, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), alquilfenóis, dioxinas e furanos (GHISELLI; JARDIM, 2007; USEPA, 2008).

Os nanomateriais passaram a ser considerados compostos de interesse emergentes, pois pouco se sabe sobre o seu destino ou efeitos ambientais (USEPA, 2008). Exemplos de produtos dessa categoria estão os nanotubos de carbono e fulerenos, que apresentam alta resistência, rigidez e condutividade térmica e elétrica, e o dióxido de titânio particulado de nano escala, um semicondutor com propriedades fotocatalíticas, eletrônicas, de conversão de energia e de detecção de gás (KAMIL *et al.*, 2017).

Em geral, alguns compostos químicos como os ftalatos e PCBs têm as indústrias como a principal fonte de poluição, já os fármacos e produtos de higiene pessoal são, comumente, originários dos efluentes sanitários (EBELE; ABDALLAH; HARRAD, 2017). Alguns estudos também têm apontado as indústrias farmacêuticas como fonte poluidora (PUTRA *et al.*, 2009; ELMOLLA; CHAUDHURI, 2012; MARCELINO *et al.*, 2016).

O tratamento das águas residuárias é fundamental para remoção dos principais compostos tóxicos, entretanto os sistemas convencionais existentes nas estações de tratamento de esgotos (ETEs) não foram desenvolvidos para a remoção desses tipos de poluentes. Sendo, portanto, incerta a eliminação dos compostos de interesse emergentes pelas ETEs, as maiores preocupações estão relacionadas com o desconhecimento sobre os efeitos na saúde em médio e longo prazo (DEBLONE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011; EBELE; ABDALLAH; HARRAD, 2017).

Deblone, Cossu-Leguille e Hartemann (2011) fizeram um levantamento bibliográfico de 45 publicações internacionais entre os anos de 1997 e 2010 que abordavam sobre a remoção desses compostos pelas estações de tratamento de esgoto. No total, 55 moléculas foram estudadas e suas concentrações no afluente e efluente das ETEs foram reportadas em

222 estudos. Segundo os autores, os antibióticos, analgésicos e anti-inflamatórios foram os mais estudados. Trimetoprim foi o composto mais avaliado dentre os artigos e, em média, sua remoção pelas ETEs foi de 40 a 50%. A cafeína apresentou elevadas concentrações nos afluentes (em média,  $56 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e remoções em torno de 97%. De modo geral, as moléculas que apresentaram maiores eficiências de remoção foram os ftalatos (90%), psicoestimulantes (97%) e bisfenol-A (70%). Já os analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e betabloqueadores apresentaram baixas eficiências de remoção, por volta de 30 a 40% (DEBLONE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011).

Embora a presença desses elementos de interesse emergente nos compartimentos ambientais não signifique necessariamente que pode causar danos à saúde humana e dos animais, muitos estudos têm evidenciado que a exposição a esses compostos afeta negativamente a vida aquática (EBELE; ABDALLAH; HARRAD, 2017). Em tese, os riscos associados incluem a persistência, bioacumulação e toxicidade.

O uso extensivo de PPCPs e a introdução de novos produtos farmacêuticos no mercado têm contribuído para a sua presença e de seus metabólitos no meio ambiente. As propriedades físico-químicas de muitos PPCPs fazem com que não sejam facilmente removidos em ETEs e o uso contínuo e a liberação desses elementos no meio fazem com que sejam considerados "pseudopersistentes", pois, embora haja a atuação dos processos ambientais (como biodegradação, fotodegradação e sorção de partículas), a reposição contínua no meio a tornam um potencial para persistência no meio ambiente (EBELE; ABDALLAH; HARRAD, 2017). Embora ainda não haja evidências sobre os efeitos negativos sobre a saúde, algumas pesquisas associam a exposição humana e animal ao PPCPs a uma série de riscos de toxicidade cancerígenos, mutagênicos e reprodutivos (LEUNG *et al.* 2013; CIZMAS *et al.*, 2015).

Os fármacos, ao contrário dos poluentes convencionais, são compostos biologicamente ativos utilizados em doses baixas (concentrações baixas) para maximizar a atividade biológica do organismo-alvo. A presença desses elementos no meio aquático aumenta o risco de efeitos ecotoxicológicos em diversos organismos não-alvo que são expostos ao fármaco involuntariamente, podendo ter alguma de suas funções metabólicas afetadas (como desenvolvimento, crescimento e reprodução) (EBELE; ABDALLAH; HARRAD, 2017). Dessa forma, a preocupação acerca dos PPCPs como poluentes emergentes está relacionada à capacidade de muitos princípios ativos poderem interferir no sistema endócrino ocasionando efeitos indesejáveis na homeostase dos organismos (FABBRI; FRANZELLITTI, 2015).

Um estudo conduzido por Vernouillet *et al.* (2010) verificou que o antiepilético carbamazepina apresenta um fator de bioacumulação de  $2,2 \text{ L kg}^{-1}$  em algas

*Pseudokirchneriella subcapitata* e de 12,6 L kg<sup>-1</sup> no crustáceo *Thamnocephalus platyuru*. Outro estudo avaliou o fator de bioacumulação de diversos fármacos em caramujos (*Planorbis* sp.) e notou que, para o antidepressivo fluoxetina, o fator é de 3000 L kg<sup>-1</sup>, para o antibiótico eritromicina é de 290 L kg<sup>-1</sup> e o anti-inflamatório não esteroide celecoxibe é de 170 L kg<sup>-1</sup> (DU *et al.*, 2015).

Um grande problema relacionado à presença dos resíduos de fármacos no meio ambiente, em especial os antibióticos, é a resistência bacteriana. Os mecanismos de resistência antimicrobiana são determinados pela taxa de mutação dos genes, pela capacidade das bactérias mutantes resistirem aos antibióticos em relação à concentração do fármaco e pela resistência à pressão de seleção dos genes (HUGHES; ANDERSSON, 2017). O nível de resistência está relacionado à concentração do composto, condições ambientais e de crescimento do organismo. Embora a presença de resíduos de alguns antibióticos no meio ambiente possa ser considerada um processo natural, a intervenção antropogênica vem intensificando a seleção dos genes mutantes, aumentando a comunidade bacteriana resistente (PIKKEMAAT *et al.*, 2016).

Um estudo conduzido por Knapp *et al.* (2008) avaliou o desenvolvimento da pressão seletiva dos genes resistentes de organismos expostos a diferentes níveis do antibiótico oxitetraciclina (20 µg L<sup>-1</sup> a 250 µg L<sup>-1</sup>) e verificou-se um aumento proporcional dos níveis dos genes de resistência ao longo do tempo e com o aumento da concentração. Tal aumento pode ser o resultado da capacidade das bactérias crescerem na presença de antibiótico, cuja origem pode ser natural ou antropogênica. A transferência das características de resistência se deve por novas mutações ou pela aquisição de modificações genéticas para resistência na bactéria, transferindo o gene para as gerações descendentes (KNAPP *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, houve um aumento no consumo de produtos farmacêuticos em escala global devido ao crescimento da população mundial, ao aumento no investimento do setor da saúde, ao avanço das indústrias farmacêuticas, à produção de medicamentos genéricos com valores mais acessíveis e ao desenvolvimento de pesquisas e tecnologias na área farmacêutica (WHO, 2004). Beek *et al.* (2016) fizeram um levantamento bibliográfico sobre consumo de fármacos acessando mais de mil publicações originais e artigos de revisão e verificaram que, entre os anos de 1984 e 2012, a substância farmacêutica mais consumida foi amoxicilina (reportada 142 vezes), seguida de trimetoprim (123 vezes), eritromicina (103 vezes), ciprofloxacina (92 vezes) e vancomicina (91 vezes).

Van Boeckel *et al.* (2014) acessaram dados de vendas e consumo de antibióticos de 71 países e perceberam que, entre os anos 2000 e 2010, houve um aumento no consumo de 36%, principalmente das classes: cefalosporinas, penicilinas de amplo espectro e fluoroquinolonas.

Foi observado também que, nesse período, o consumo foi maior em países em desenvolvimento, especialmente nos BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), correspondendo a 76% do aumento global do consumo de antibióticos. Notou-se também que, entre 2000 e 2010, o aumento populacional nos países BRICS foi de 33% do aumento geral da população global, indicando que o consumo de antibióticos nesses países se deu por diversos fatores, tais como crescimento econômico, aumento das despesas no setor médico e aumento do acesso da população aos medicamentos, e não somente devido ao crescimento demográfico (VAN BOECKEL *et al.*, 2014).

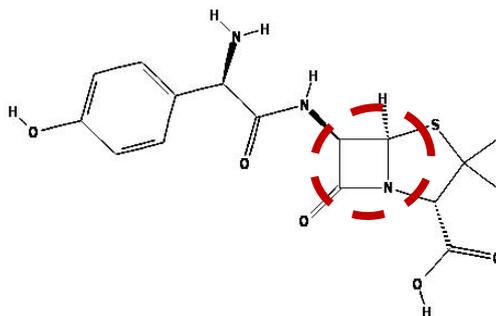
O consumo de produtos farmacêuticos no cenário brasileiro pode ser observado no levantamento de dados feito pela Pesquisa Nacional de Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos (PNAUM-2014). Esta pesquisa foi instituída pela portaria GM/MS 2077 em 2012, por meio do Ministério da Saúde, devido à necessidade de avaliar as políticas públicas de assistência farmacêutica, como o acesso, a utilização e o uso racional de medicamentos no Brasil (MENGUE *et al.*, 2016). Realizada em residências de municípios, a PNAUM-2014 abrangeu as cinco regiões do país com o objetivo de avaliar o consumo e uso racional dos fármacos pela população brasileira no tratamento de suas morbidades, seja doenças crônicas ou eventos agudos (BERTOLDI *et al.*, 2016).

Segundo os dados levantados pela PNAUM-2014, a amoxicilina é o produto farmacêutico mais utilizado da classe dos antimicrobianos, o paracetamol nos casos de condições agudas e os fármacos losartana, metformina e atenolol para tratamento de doenças crônicas (BERTOLDI *et al.*, 2016).

### **3.2. Amoxicilina**

A amoxicilina é um antibiótico do tipo penicilina, pertence ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos e tem amplo espectro de atuação contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Esse tipo de antibiótico atua destruindo as paredes celulares das bactérias quando estão no processo de reprodução (BAGHAPOUR *et al.*, 2014). A estrutura molecular da amoxicilina está apresentada na Figura 1, com destaque para o anel  $\beta$ -lactâmico.

**Figura 1 – Estrutura química da amoxicilina com destaque para o anel  $\beta$ -lactâmico.**



Fonte: adaptado de PubChem (2005)

Algumas propriedades físico-químicas da amoxicilina estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1 – Características físico-químicas da amoxicilina.**

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Fórmula molecular	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
Massa molar	$365,404 \text{ g mol}^{-1}$
Solubilidade em água a $20 \text{ }^\circ\text{C}$	$3430 \text{ mg L}^{-1}$
$pK_a$	2,68; 7,49 e 9,63
Coefficiente de partição octanol/ água ( $\log k_{ow}$ )	0,87
Coefficiente de partição carbono orgânico/ água ( $\log k_{oc}$ )	2,94

Fonte: PAVLOVIĆ *et al.* (2007); MANSOURI *et al.* (2015); KIM *et al.* (2016)

A estrutura molecular da amoxicilina apresenta três grupos ionizáveis com diferentes valores de  $pK_a$ . Para valores de pH entre 3 a 6, a molécula encontra-se na forma neutra, em que suas formas iônicas estão em equilíbrio iônico (GODDARD *et al.*, 1996).

A prescrição do uso de amoxicilina ainda é elevada, devido a sua grande eficácia no combate à maioria das bactérias patogênicas, baixo custo e poucos efeitos colaterais, sendo que sua utilização acontece na medicina humana e veterinária (ELIZALDE-VELÁZQUEZ *et al.*, 2016). Quando ingerida, apenas uma pequena porcentagem da amoxicilina é metabolizada pelo organismo e cerca de 80 a 90% são excretadas sem alteração chegando às estações de tratamento de esgoto (ETEs) e de tratamento de água para reúso (ETAR), que, por suas características de concepção, não dispõem de tratamento eficazes para sua completa remoção (BOUND; VOULVOULIS, 2004; BLAIR, 2016). Como consequência do aumento do consumo e da baixa absorção pelo organismo, passou-se a detectar o composto nos diversos compartimentos ambientais. A Tabela 2 apresenta as concentrações de amoxicilina encontradas em diferentes matrizes ambientais em diversos países.

Tabela 2 – Concentrações de amoxicilina encontradas em diferentes matrizes ao redor do mundo.

Matriz	Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	País	Referência
Rios	48	Alemanha	CHRISTIAN <i>et al.</i> , 2003
	200	Austrália	WATKINSON <i>et al.</i> , 2009
	0,46 - 1284	Brasil	LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2010
	0,35 – 2,72	China	YIN <i>et al.</i> , 2010
	2,02 – 9,91	Itália	ZUCCATO <i>et al.</i> , 2010
	39 - 245	Reino Unido	KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2007;
Mar	0,64 – 76	Hong Kong	MINH <i>et al.</i> , 2009
Água da torneira	12,5	China	YIN <i>et al.</i> , 2010
Esgoto hospitalar	900	Austrália	WATKINSON <i>et al.</i> , 2009
Esgoto de indústria farmacêutica	120.000.000	Brasil	MARCELINO <i>et al.</i> , 2016
	317.000.000	Indonésia	PUTRA <i>et al.</i> , 2009
	138.000.000	Reino Unido	ELMOLLA; CHAUDHURI, 2012
Afluente de ETEs	280 - 6940	Austrália	WATKINSON; MURBY; COSTANZO, 2007; WATKINSON <i>et al.</i> , 2009
	18 - 352	Itália	CASTIGLIONI <i>et al.</i> , 2006; ZUCCATO <i>et al.</i> , 2010
	500	Japão	MATSUO <i>et al.</i> , 2011
	100.000 - 150.000	EUA	MORSE; JACKSON, 2003
Efluente de ETEs	50	Austrália	WATKINSON <i>et al.</i> , 2009
	64 - 1670	Hong Kong	MINH <i>et al.</i> , 2009
	1,80 - 272	Itália	ANDREOZZI <i>et al.</i> , 2004; CASTIGLIONI <i>et al.</i> , 2006; WATKINSON; MURBY; COSTANZO, 2007

Produtos de degradação da amoxicilina também são alvos de estudos, os quais podem ser originados por biodegradação natural do composto original ou por processos químicos ou fotoquímicos em que o composto é submetido (GOZLAN; ROTSTEIN; AVISAR, 2013). Pérez-Parada *et al.* (2011) observaram que a hidrólise é o principal processo de formação dos subprodutos pois está relacionada com a instabilidade e quebra do anel  $\beta$ -lactâmico da molécula. Gozlan, Rotstein e Avisar (2010) identificaram alguns produtos de degradação frequentemente encontrados, principalmente, em rios e os denominaram como: ácido penicilóico amoxicilínico, ácido penilóico amoxicilínico I e II, amoxicilina diketopiperazina, pirazinona e 4-hidroxifeniglil amoxicilina, cujos potenciais de toxicidade ainda são desconhecidos.

Os principais problemas da presença da amoxicilina no meio ambiente estão relacionados à saúde humana, como alergia ao medicamento e problemas toxicológicos graves, e à indução da seleção das bactérias resistentes ao antibiótico (CABELLO, 2006; GAVRILESCU *et al.*, 2015). Esses riscos e efeitos diretos ou indiretos sobre a saúde humana pelo consumo passivo e ativo de antibióticos têm levado a definir regulamentações sobre a utilização de alguns antibióticos e ao estabelecimento de limites máximos e mínimos de resíduos. Nos Estados Unidos, por exemplo, a tolerância para os resíduos de amoxicilina é de 0,1 ppm ( $10 \text{ ng g}^{-1}$ ) no leite e no tecido bovino não cozido (ELIZALDE-VELÁZQUEZ *et al.*, 2016).

No Brasil, atualmente, não há regulamentação para o controle de resíduos farmacêuticos no meio ambiente. Já no âmbito internacional, por meio das Diretivas 2000/60/CE, 2008/105/CE, 2013/39/EU e 2015/495 que estabelecem normas de qualidade ambiental no domínio de política da água, a União Europeia criou uma lista de vigilância para monitorar 45 substâncias prioritárias a fim de determinar seu risco ambiental (EUROPEAN UNION, 2000; 2008; 2013; 2015). Entretanto, dentre os fármacos, apenas os antibióticos macrolídeos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) foram listados (BARBOSA *et al.*, 2016).

### **3.3. Tratamento de Esgotos**

Esgoto, segundo definido por Metcalf e Eddy (2016), é a água de abastecimento após ser usada em diferentes aplicações, contendo constituintes que, sem tratamento, a tornam imprópria para a maioria dos usos. O esgoto bruto, em geral, contém diversos organismos patogênicos que se desenvolvem no intestino humano, nutrientes que podem superestimular o crescimento de plantas aquáticas acelerando a eutrofização, e matéria orgânica que, quando entra em processo de decomposição, leva a condições desagradáveis, incluindo a produção de gases com maus odores e perda da qualidade estética da água (METCALF e EDDY, 2016).

O esgoto é um resíduo muito complicado de dispor devido ao seu estado físico, composição e potencial de poluição. Os métodos de tratamento de esgoto foram desenvolvidos com enfoque na saúde pública e nas condições adversas causadas pela destinação do esgoto no meio ambiente. As primeiras estratégias visavam remover sólidos suspensos e flutuantes; posteriormente o foco era remover compostos orgânicos biodegradáveis, e por fim, desenvolveram-se técnicas para eliminação de organismos patogênicos (METCALF e EDDY, 2016). Atualmente, tem se desenvolvido e implementado tecnologias que identifiquem, quantifiquem, monitorem e removam esses compostos de interesse emergentes de efluentes.

São inúmeros os contaminantes que podem estar presentes nos efluentes, como elementos traços, microrganismos, contaminantes de interesse emergentes, entre outros. Os compostos orgânicos incluem as substâncias húmicas, material fecal, restos de alimentos, detergentes, óleos, graxas, produtos de consumo, resíduos industriais e outros. Os efeitos adversos dessas substâncias incluem: efeitos estéticos (cor e odor), presença de material particulado que pode entupir pequenas tubulações ou acumular no solo e afetar a permeabilidade, proliferação de microrganismos, consumo de oxigênio por decomposição, interação com agentes de desinfecção, tornando-os menos efetivos ou até formar subprodutos do processo; a ingestão humana pode também resultar em efeitos agudos ou crônicos para a saúde (USEPA, 2012).

Relacionado aos impactos e riscos ao meio ambiente e à saúde humana proporcionados pelo lançamento inadequado de esgoto, tem-se o tratamento de esgoto como uma prática sustentável, que depende do equilíbrio dinâmico entre o desenvolvimento econômico, a proteção ambiental e a inclusão social (HESPANHOL, 2015).

O tratamento de efluentes visa reduzir e/ou evitar a poluição do corpo receptor. Os sistemas de tratamento, em geral, correspondem às tecnologias de controle da poluição, pois se trata de um conjunto de processos que foram desenvolvidos para mitigar os impactos dos resíduos gerados pelos centros urbanos e industriais após o processamento e utilização da água (NRC, 2012). Usualmente, são classificados nos níveis preliminar, primário, secundário e terciário (este existindo eventualmente).

O tratamento preliminar promove a remoção de sólidos grosseiros através de grades de diferentes espaçamentos. O primário tem como objetivo a remoção de sólidos sedimentáveis e a separação de materiais sobrenadantes (óleos e gorduras), é removida também parte da matéria orgânica. Comumente, o processo de remoção nestas fases se dá por métodos físicos. Em geral, a principal função do tratamento primário é preparar o efluente para os tratamentos posteriores (VON SPERLING, 2005; PINHO *et al.*, 2017). Já o tratamento secundário atua diretamente na remoção de matéria orgânica, compostos solúveis e sólidos suspensos biodegradáveis e, eventualmente, de nutrientes como fósforo e nitrogênio utilizando mecanismos biológicos aeróbios e anaeróbios (PINHO *et al.*, 2017).

O tratamento terciário, também conhecido por tratamento avançado, objetiva a remoção de poluentes específicos (tóxicos, emergentes, persistentes e/ou recalcitrantes), de organismos patogênicos e a remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário, como fósforo total e a série nitrogenada (JUDD, 2011).

Uma grande variedade de opções de sistemas de tratamento existe para reduzir a carga orgânica e mitigar microrganismos e compostos químicos de efluentes, acarretando em uma

infinitude de combinações de processos que podem ser adaptados para atender objetivos específicos de qualidade da água (NRC, 2012).

Muitas técnicas de tratamento convencionais foram estudadas com vistas à remoção de antibióticos em águas e efluentes. Aquino, Brandt e Chernicharo (2013) realizaram uma revisão bibliográfica sobre a remoção de fármacos e disruptores endócrinos por lodos ativados convencionais e observaram que alguns fármacos passam praticamente incólumes pelos sistemas de lodos ativados, e outros apresentam uma remoção parcial. Isso mostra a necessidade de um tratamento mais específico, além do sistema convencional de tratamento de esgoto, para obter elevada eficiência (acima de 90%) na remoção desses compostos de interesse emergente.

Pode-se dizer que a contínua presença desses compostos no ambiente aquático se deve, principalmente, a essa ineficiência do tratamento convencional presente nas estações de tratamento de esgotos (ETE) e estações de tratamento de água (ETA) em remover tais elementos (VIRKUTYTE; VARMA; JEGATHEESAN, 2010). Alguns estudos indicam que os tratamentos convencionais, como, por exemplo, a coagulação e sedimentação química, não são eficientes no processo de remoção de produtos farmacêuticos recalcitrantes, sendo, portanto, necessário aplicar tecnologias mais avançadas de tratamento para conseguir a proteção sustentável do ambiente (WESTERHOFF *et al.*, 2005; GRANDCLÉMENT *et al.*, 2017), como, por exemplo, o sistema de biorreatores com membranas.

### **3.4. Biorreatores com membranas (MBR)**

O sistema de biorreator com membranas (MBR, do inglês “*Membrane Biological Reactor*”) é uma tecnologia que combina o processo de degradação biológica de lodos ativados com uma separação sólido-líquido por uma membrana de filtração (JUDD, 2011).

O reator biológico opera com microrganismos aglomerados na forma de flocos que ficam em suspensão por agitação mecânica ou aeração e são os principais responsáveis pela degradação dos poluentes. As concentrações típicas de Sólidos Suspensos Totais (SST) em MBR podem variar de 5.000 a 20.000 mg L<sup>-1</sup> segundo Stephenson *et al.* (2000) ou 15.000 a 25.000 mg L<sup>-1</sup> segundo Cote (1998).

Quando aplicados em tecnologia ambiental, as membranas utilizadas são, em geral, de microfiltração e ultrafiltração instaladas ou associadas a reatores biológicos. Então, o sistema MBR consiste na degradação de compostos mediada por microrganismos e a permeação do efluente tratado através da membrana que retém a biomassa (SANT’ANNA JR; CERQUEIRA, 2011). Este processo de tratamento, portanto, recebe o esgoto bruto e fornece um efluente tratado com qualidade elevada, comparável aos sistemas terciários. Assim, pode

ser considerado como tecnologia sustentável devido à capacidade de remover matéria orgânica, nutrientes, sólidos, bactérias e vírus, compostos de interesse emergentes e produtos farmacêuticos recalcitrantes, gerando um efluente tratado de elevada qualidade que pode ser utilizado para reúso em diversas aplicações, seja potável, industrial, recreacional, urbano não potável, entre outras (HESPANHOL, 2015).

Devido a esta vantagem, diversas empresas e concessionárias, como a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) e a Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA), têm adotado MBR para melhorar a qualidade da água de reúso e viabilizar a venda do insumo para a indústria (MAZZONETTO, 2012). A concepção da ETE com MBR em Campos do Jordão, por exemplo, foi motivada pelas restrições legais de lançamento em um rio de classe 2 de baixa vazão, o Rio Sapucaí-Guassu; já a ETE ABC conta com um sistema MBR de reúso para atender o polo petroquímico do Grande ABC, devido à escassez hídrica da região (RUBIM, 2015).

As membranas podem ser classificadas conforme o tipo de filtração, ou seja, conforme o tamanho dos poros da membrana, as substâncias passantes e a força motriz que promove a separação dos contaminantes. Esta classificação pode ser observada na Tabela 3.

**Tabela 3 - Classificação do tipo de filtração por membranas.**

<b>Tipo de Filtração</b>	<b>Força motriz</b>	<b>Diâmetro dos poros (nm)</b>	<b>Compostos removidos</b>
Microfiltração	Pressão hidrostática diferencial ou vácuo	> 50	Turbidez, protozoários, algumas bactérias e vírus
Ultrafiltração	Pressão hidrostática diferencial	2 - 50	Macromoléculas, colóides, maioria das bactérias, alguns vírus e proteínas
Nanofiltração	Pressão hidrostática diferencial	< 2	Pequenas moléculas, vírus, dureza
Osmose Reversa	Pressão hidrostática diferencial	< 2	Moléculas muito pequenas, corantes, dureza, íons monovalentes
Diálise	Diferença de concentração	2 - 50	Macromoléculas, colóides, proteínas
Eletrodialise	Potencial elétrico	< 2	Sais iônicos

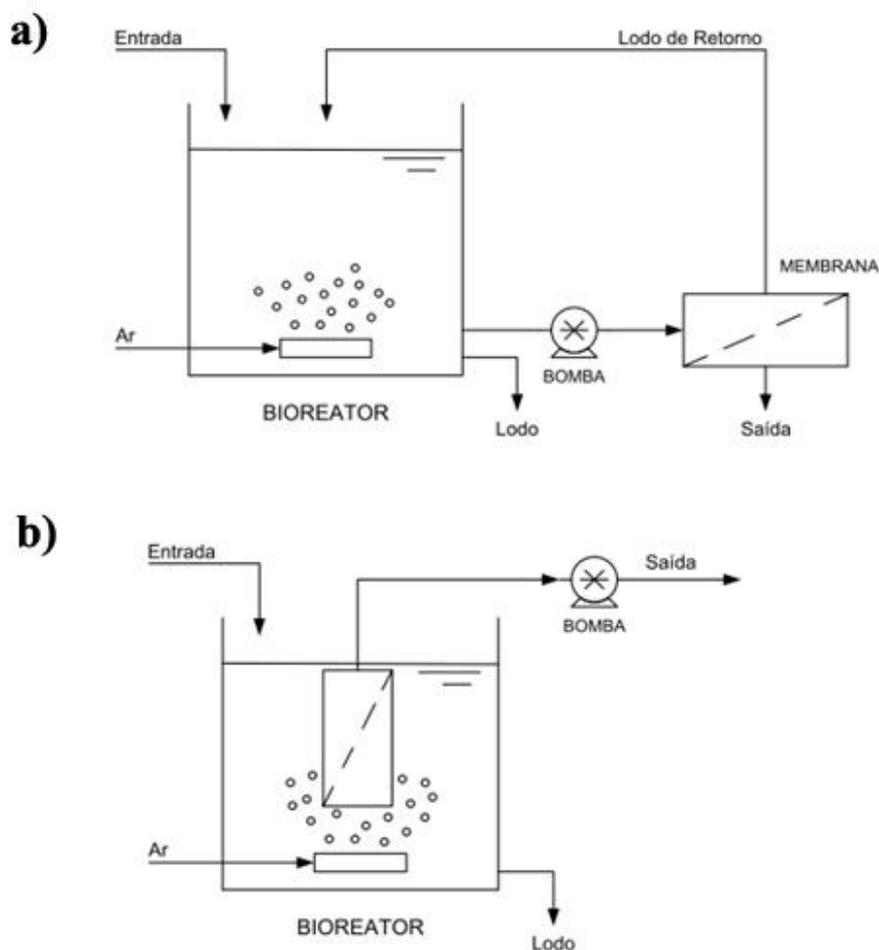
Fonte: Adaptado de METCALF & EDDY (2016)

O sistema MBR surgiu ao final da década de 1960 com o desenvolvimento e a comercialização das membranas de micro e ultrafiltração. Registros na literatura contam que o projeto original foi introduzido por Dorr Oliver, em 1966, combinando o uso de biorreatores com biomassa suspensa e um módulo externo de sistema de ultrafiltração (SMITH; DIGREGORIO; TALCOTT, 1969 *apud* LE-CLECH; CHEN; FANE, 2006). No entanto, o alto custo das membranas, baixo valor econômico do produto e alto potencial de perda de desempenho por incrustações tornaram o sistema pouco interessante na época (LE-CLECH; CHEN; FANE, 2006). O cenário mudou quando Yamamoto *et al.* (1989) utilizaram o módulo

de membrana submersas no reator e outros trabalhos desenvolvidos posteriormente contribuíram para aprimorar o sistema e reduzir seus custos.

Duas configurações do sistema MBR mais conhecidas são: biorreator com membranas em módulo externo e biorreator com membranas submersas (NG; KIM, 2007), apresentadas na Figura 2.

**Figura 2 – Configurações do sistema MBR: (A) Biorreator com membranas em módulo externo; (B) Biorreator com membranas submersas.**



Fonte: BEZERRA (2010)

Na disposição apresentada na Figura 2A, os módulos de membrana, instalados fora do tanque aerado, são do tipo tubular; o processo ocorre com o bombeamento do conteúdo do biorreator para os módulos e a recirculação do lodo de volta para o reator (NG; KIM, 2007). Esse tipo de MBR exige altas velocidades de recirculação no módulo para reduzir a tendência de *fouling* e consequente redução de fluxo de permeado. Assim, essa configuração de MBR apresenta um elevado consumo energético devido à bomba de recirculação e das altas tensões de cisalhamento geradas no processo de filtração para obtenção de alto fluxo de permeado (BRINDLE; STEPHENSON, 2000; SANT'ANNA JR; CERQUEIRA, 2011).

Os biorreatores com membranas submersas (MBR), na Figura 2B, contam com o módulo de membranas no interior do tanque aerado. De modo geral, os módulos de membranas utilizados neste caso são de fibra-oca ou placa-plana, o lodo presente no biorreator fica em contato com a superfície externa das membranas e o filtrado é succionado após passar pelas paredes da mesma, fazendo com que o concentrado permaneça no tanque (NG; KIM, 2007).

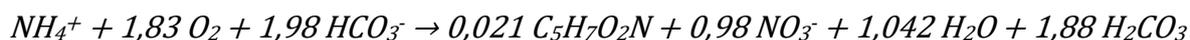
O sistema de aeração tem como objetivo fornecer oxigênio necessário para os microrganismos realizarem as reações bioquímicas de consumo de substratos, degradação dos compostos e tratamento do efluente, além de manter o lodo em suspensão. Em MBR, a aeração também é importante para a prevenção do *fouling*, pois o cisalhamento provocado pelas bolhas de ar, ao entrar em contato com a superfície das membranas, diminui a deposição e remove algumas partículas, reduzindo a taxa de aumento da pressão transmembrana, além de promover um fluxo tangencial para o processo de filtração (CADORE *et al.*, 2014).

### 3.4.1. Remoção de Nitrogênio por MBR

O biorreator do MBR pode ser configurado de diversas formas dependendo do objetivo do tratamento e qualidade do permeado desejado, como por exemplo, visando remover nitrogênio do afluente. A importância de remover nutrientes de esgoto, em especial o nitrogênio, está associada à redução do impacto na eutrofização de corpos d'água que recebem o efluente tratado (FERREIRA; CUNHA-SANTINO; JÚNIOR, 2015). A remoção da série nitrogenada pode ocorrer em um reator biológico pelo processo de amonificação, nitrificação e desnitrificação.

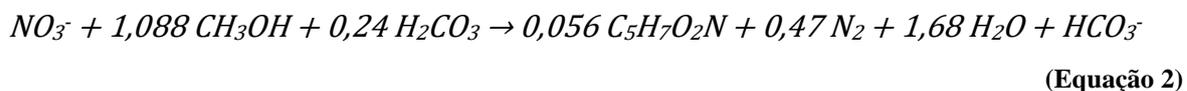
A amonificação consiste na conversão biológica do nitrogênio orgânico solúvel para sua forma amoniacal (METCALF; EDDY, 2016).

O processo de nitrificação ocorre em duas etapas: (1) nitritação, em que há a conversão do nitrogênio amoniacal ( $N-NH_4^+$ ) em nitrito ( $NO_2^-$ ) pelas bactérias autotróficas oxidadoras de amônia (BOA); (2) nitratação, onde o nitrito é oxidado a nitrato ( $NO_3^-$ ) pelas bactérias autotróficas oxidadoras de nitrito (BON). Para que esse processo ocorra, é preciso que o fornecimento de oxigênio dissolvido seja suficiente para não comprometer o desenvolvimento dessas bactérias nitrificantes (FLECK; EYNG; TAVARES, 2015; METCALF; EDDY, 2016). A reação de nitrificação foi equacionada por Ahn (2006) e apresentada na Equação 1.



(Equação 1)

A desnitrificação ocorre em uma fase subsequente à nitrificação, em que, na ausência de oxigênio e presença de carbono orgânico, o nitrato passa ser utilizado pelas bactérias heterotróficas como aceptor de elétrons na respiração. Nesse processo, ocorre a redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) em nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) (FLECK; EYNG; TAVARES, 2015). A reação de desnitrificação está indicada na Equação 2 (AHN, 2006).



De modo geral, ambos os processos para remoção biológica de nitrogênio podem ser influenciados com a variação de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e presença de substâncias tóxicas. O pH ótimo de trabalho é próximo à neutralidade, podendo variar entre 6,0 a 8,0; a temperatura ótima para o desenvolvimento das bactérias envolvidas no processo é em torno de 35 °C; o oxigênio dissolvido deve ser abundante para a nitrificação e ausente para a desnitrificação; e a presença de substâncias tóxicas pode inibir o desempenho das bactérias nitrificantes e, conseqüentemente, a desnitrificação também pode não ocorrer (GUILLÉN, 2016). Nas etapas de nitrificação e desnitrificação ocorre, respectivamente, o consumo e produção de alcalinidade (METCALF; EDDY, 2016).

### 3.4.2. Processos de remoção de fármacos em sistema MBR

Os principais processos de remoção de fármacos utilizando sistema MBR ocorrem pelos mecanismos de biodegradação pelos microrganismos na biomassa, sorção no lodo e/ou retenção física pelas membranas (TAMBOSI *et al.*, 2010; BESHA *et al.*, 2017), são as características dos fármacos que determinam o mecanismo predominante para removê-los.

A biodegradação corresponde à degradação de compostos por microrganismos e representa o principal mecanismo de remoção para muitos micropoluentes (SIPMA *et al.*, 2010). Grupos funcionais da molécula que constitui o fármaco, como ésteres, nitrilos e álcoois aromáticos, ou compostos polares com grupos de doação eletrônica são mais propensos a serem removidos por biodegradação (FAN *et al.*, 2014). Esse processo pode ser total ou parcial, com a formação de metabólitos e produtos de degradação desconhecidos, que podem ser mais ou menos tóxicos que em sua forma inicial (BEAUSSE, 2004; JUDD, 2011). Diversos fatores podem influenciar na biodegradação dos fármacos, tais como origem do lodo, idade do lodo, composição do esgoto, a configuração do reator (aeróbio, anaeróbio ou

anóxico) entre outros, que tornam a eficiência de remoção por atuação da biomassa diferente para cada composto (BESHA *et al.*, 2017).

O processo de adsorção é um fenômeno físico-químico em que moléculas da fase líquida (adsorvato) são transferidas para a superfície de uma fase sólida (adsorvente). Esse processo depende da constante de dissociação ácida ( $pK_a$ ) e promove uma interação eletrostática do micropoluinte (carga positiva) na superfície do microrganismo (carga negativa) (SIPMA *et al.*, 2010). Compostos apolares ou com estruturas que contam com grupos amida iodado, nitro-, azo-, sulfo-, halógenos e aromáticos são resistentes à biodegradação e a sorção e retenção pela membrana são os mecanismos principais de remoção (BESHA *et al.*, 2017).

Segundo Kimura *et al* (2005), alguns dos compostos são removidos pelo sistema MBR por esse apresentar elevado tempo de retenção de sólidos (TRS) e adaptação dos microrganismos aos compostos menos (bio)degradáveis.

A retenção física pela membrana é outro mecanismo responsável pela remoção de compostos no MBR. Esse mecanismo leva em consideração a massa molar de corte das membranas de micro (MF) ou ultrafiltração (UF) utilizadas (TAMBOSI, 2010). Entretanto, conforme observaram Taheran *et al.* (2016), a maioria dos fármacos não são retidos pelas membranas de MF e UF, pois a massa molar desses compostos é muito menor que a massa molar de corte das membranas.

A Tabela 4 apresenta a concentração de alguns fármacos removidos pelos mecanismos do sistema MBR

**Tabela 4 – Remoção de fármacos pelos processos de biodegradação e sorção em sistemas MBR.**

Fármaco	Remoção (%)		Referência
	Biodegradação	Sorção	
Ibuprofeno	90-100	< 5	JOSS <i>et al.</i> , 2006
Diclofenaco	5-45	< 5	BEHERA <i>et al.</i> , 2011
Sulfametoxazol	50-90	0	BEHERA <i>et al.</i> , 2011
Carbamazepina	40	< 5	Kim <i>et al.</i> , 2014
Azitromicina	49	20	Kim <i>et al.</i> , 2014
Tetraciclina	0	98	Kim <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Autora (2018).

Assim, para uma maior eficiência de remoção, sugere-se integrar o sistema MBR ao sistema de nanofiltração, de osmose reversa ou de adsorção em carvão ativado, uma vez que o MBR sozinho não é capaz de obter grandes porcentagens de eficiência de remoção (>95%) principalmente de compostos pouco biodegradáveis (BESHA *et al.*, 2017).

Outros processos de redução da concentração do fármaco podem ocorrer durante o tratamento por MBR, como por exemplo, a hidrólise, fotodegradação e volatilização.

Na hidrólise verifica-se a quebra da estrutura do composto farmacêutico por ação da molécula de água. No caso de alguns antibióticos peniciloicos, há a quebra do anel  $\beta$ -lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas (SILVA *et al.*, 2013). Em geral, muitas pesquisas desprezam a concentração hidrolizada uma vez que os processos biológicos desempenham um papel mais expressivo (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

A fotodegradação consiste na degradação do composto na presença de radiação UV, podendo ser direta ou indireta e utilizando uma fonte de radiação natural (ex.: sol) ou artificial. No processo de fotodegradação direta, há a degradação da molécula quando exposta à radiação UV, e no processo indireto, há a formação de radicais que são responsáveis pela degradação da molécula alvo (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013). A parcela fotodegradada do fármaco é, muitas vezes, desprezível, pois a configuração do sistema de tratamento não é favorável. Esse processo sofre interferência da concentração de sólidos suspensos no efluente e licor misto, da fração de radiação UV recebida e da área superficial disponível para receber radiação (ZHANG; GEIBEN; GAL, 2008).

A volatilização é um processo que está relacionado com a Constante de Henry, que determina a constante de proporcionalidade entre as moléculas presentes na fase líquida e na fase gasosa e está relacionada com a pressão parcial que o gás exerce no líquido (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013). Esse mecanismo de remoção de compostos farmacêuticos é, geralmente, desprezado, pois eles são poucos voláteis devido à elevada massa molar (SUÁREZ *et al.*, 2008).

### **3.5. Ecotoxicologia**

O termo "ecotoxicologia" foi sugerido pela primeira vez no final da década de 1960 pelo toxicologista René Truhaut e adotado pelo Comitê Científico sobre Problemas do Meio Ambiente (SCOPE, do inglês "*Scientific Committee on Problems of the Environment*") e pelo Conselho Internacional de Uniões Científicas (ICSU, do inglês "*International Council of Scientific Unions*"). Segundo Truhaut (1975), o termo pode ser definido como sendo "o ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos causados por substâncias naturais ou por poluentes artificiais em organismos vivos, sejam eles animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera".

A ecotoxicologia aplicada ao ecossistema aquático é uma ferramenta para monitoramento ambiental que relaciona a concentração dos xenobióticos, o ambiente receptor desses compostos e os organismos presentes, e tem como base a respostas de organismos

individuais a estressores químicos (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008; SILVA *et al.*, 2015). Para garantir que os resultados sejam válidos e comparáveis, foram desenvolvidos protocolos de testes de ecotoxicidade pelas agências ambientais, como USEPA e OECD no âmbito internacional e CETESB e ABNT no cenário nacional. De modo geral, os riscos de toxicidade de substâncias químicas ou de amostras ambientais e a forma que são manifestados seus efeitos são obtidos observando as respostas de organismos indicadores, como alguma alteração fisiológica, morfológica ou comportamental, ao serem expostos às amostras ambientais ou a diferentes concentrações de tais compostos químicos (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008).

Os estudos dos efeitos de toxicidade podem ser classificados de acordo com a exposição que os organismos testes são submetidos: aguda, crônica ou crônica de curta duração. A toxicidade aguda expõe os organismos em um curto período de duração, como algumas horas ou alguns dias; a crônica são os ensaios de exposição prolongada e abrange todo o ciclo de vida dos organismos-teste e avaliam, por exemplo, a reprodução e crescimento, e os ensaios de toxicidade crônica de curta duração diferem do anterior devido ao tempo de exposição reduzido e à avaliação apenas dos períodos sensíveis do ciclo de vida dos organismos testados (LAWS, 2017).

O avanço das pesquisas sobre ensaios ecotoxicológicos para o controle da poluição hídrica possibilitou a elaboração de leis vigentes, como o CONAMA 357, que estabelece padrões de qualidade de águas, e o CONAMA 430, relacionado aos efluentes industriais. Entretanto, ainda não há regulamentação nacional de disposição e de limite de concentração nas matrizes ambientais para os residuais de fármacos e outros compostos de interesse emergente.

### **3.5.1. Organismos utilizados em ensaios de ecotoxicidade**

O monitoramento dos níveis de poluição ambiental é realizado avaliando alguns parâmetros físico-químicos como nitrogênio, oxigênio dissolvido, matéria orgânica, entre outros, que, por sua vez, não fornecem informações sobre os efeitos biológicos. Para isso, são utilizados alguns organismos sensíveis para uma grande variabilidade de compostos químicos e que podem ser avaliados por métodos simples, rápidos, fáceis e economicamente baratos (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006). Dentre os organismos mais comumente usados estão *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Daphnia similis*, algas e plantas.

*Vibrio fischeri* é uma bactéria marinha pertencente à família dos *Vibrionaceae*, são gram-negativas, halófila, anaeróbia facultativa, em forma de bastão, flagelada, não patogênica

e bioluminescentes (RUBY *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2018). A resposta da bioluminescência é mais sensível para uma grande diversidade de produtos químicos do que ensaios utilizando bactérias, crustáceos, peixes, respirometria, inibição de enzimas, entre outros (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006).

Pequenos crustáceos do gênero *Daphnia sp.* são muito utilizados em testes de ecotoxicidade, pois têm ampla distribuição no ambiente aquático, têm o ciclo de vida curto, apresenta reprodução rápida por partenogênese, pode influenciar na cadeia alimentar próxima por servir de alimento a peixes e predadores dos invertebrados e são bastante sensíveis à grande quantidade de compostos químicos e contaminantes aquáticos. Seu papel na cadeia alimentar é de consumidor primário, atuando como filtros de material orgânico particulado como algas unicelulares (TATARAZAKO; ODA, 2007).

As algas são um dos principais representantes da comunidade aquática, pois realizam a ciclagem de nutrientes, fornecem oxigênio através da fotossíntese e são base da cadeia alimentar para diversos organismos mais complexos. Além disso, são sensíveis a muitas substâncias químicas, sendo, portanto, frequentemente usados em testes de toxicidade aquática (STAVELEY; SMRCHEK, 2005).

Testes de fitotoxicidade utilizam plantas vivas para avaliar o grau de toxicidade de compostos químicos presentes por meio de sua capacidade de absorver, acumular e metabolizar os micropoluentes verificando seu processo de germinação e crescimento da raiz (BARTRONS; PEÑUELAS, 2017). Esses organismos são muito utilizados em ensaios ecotoxicológicos por requererem um método simples e barato para o biomonitoramento ambiental, além disso, é possível utilizar diferentes espécies de vegetais, como trigo, soja, tomate, pepino, rúcula, brócolis, alface, mostarda, entre outros. (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005; SALVATORE; CARAFA; CARRATÙ, 2008).

### **3.5.2. Ensaio de respirometria**

Outro tipo de ensaio que avalia a toxicidade de compostos é a respirometria, uma técnica que mede a respiração do metabolismo microbiano aeróbio pelo consumo de O<sub>2</sub> ou pela produção de CO<sub>2</sub>. A proposta do ensaio respirométrico é fornecer uma avaliação rápida sobre os efeitos das substâncias nos microrganismos aeróbios do lodo das estações de tratamento de águas residuárias, e os resultados podem servir de indicador de concentrações não inibitórias adequadas de determinadas substâncias (OECD, 2010). Van Haandel *et al.* (1998) nomearam como “Toximetria” os testes respirométricos aplicados para avaliar a presença de substâncias tóxicas ou inibidoras no afluente.

A técnica de respirometria baseia-se na medição da taxa biológica de consumo de oxigênio (Taxa de Consumo de Oxigênio – TCO) em condições experimentais controladas, uma vez que o consumo de oxigênio por parte dos microrganismos está associado ao crescimento da biomassa e à remoção de substrato (MACFARLANE, 2017). A presença de substâncias tóxicas ou inibidoras no afluente promove a toxicidade no sistema biológico e resulta na diminuição da capacidade metabólica da biomassa, reduzindo o valor da TCO sem que haja uma redução da carga orgânica aplicada (VAN HAANDEL *et al.*, 1998).

O consumo de oxigênio pelos microrganismos do lodo se desenvolve em duas fases principais: a respiração endógena e o catabolismo do substrato. A respiração endógena está associada ao oxigênio necessário para a respiração da biomassa na ausência de aeração, correspondendo à energia requerida para manter as funções das células. O catabolismo do material orgânico representa o oxigênio consumido pelos microrganismos para degradar o substrato presente no afluente (COSTA *et al.*, 2001; ANDREOTTOLA *et al.*, 2005). A velocidade do consumo de oxigênio é proporcional à facilidade de degradação dos substratos ou associada à disponibilidade destes no meio; em outras palavras, o consumo de substrato pelos microrganismos aumenta a velocidade do consumo de oxigênio e, quando na ausência dos mesmos, o consumo de oxigênio é mais lento (ANDREOTTOLA *et al.*, 2005).

Spanjers (1993) contribuiu para o aperfeiçoamento de aparelhos que realizam os ensaios de respirometria, chamados de respirômetros, que medem a concentração de oxigênio dissolvido (OD) e calculam a taxa de respiração pela variação do valor de OD ao longo do tempo. Os respirômetros podem ser classificados como fechados manométricos ou volumétricos, ou abertos de aeração contínua ou semicontínua. Respirômetros abertos permitem a troca gasosa da biota com o ambiente e monitoram a variação da concentração de oxigênio dissolvido utilizando uma sonda de OD. O método de aeração semicontínua foi desenvolvido por Catunda *et al.* (1996) e consiste em interrupções da aeração de forma a manter a concentração de OD dentro de uma determinada faixa e calcular a TCO de acordo com o tempo em que a concentração de OD decai do limite superior ao limite inferior.

Ricco *et al.* (2004) compararam o procedimento da respirometria com o ensaio de Microtox<sup>®</sup> (um teste baseado na bioluminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri*), avaliando a toxicidade de quatro compostos xenobióticos: 3,5-diclorofenol, formaldeído, 4-nitrofenol e diclorometano em sistemas biológicos de tratamento de esgoto. Os coeficientes de variação entre 2-10% para a respirometria e 6-15% para Microtox<sup>®</sup> indicaram boa reprodutibilidade para ambos os métodos biológicos. Observaram-se, também, que 3,5-diclorofenol foi o mais tóxico dos compostos investigados e o diclorometano teve menor toxicidade (RICCO *et al.*, 2004).

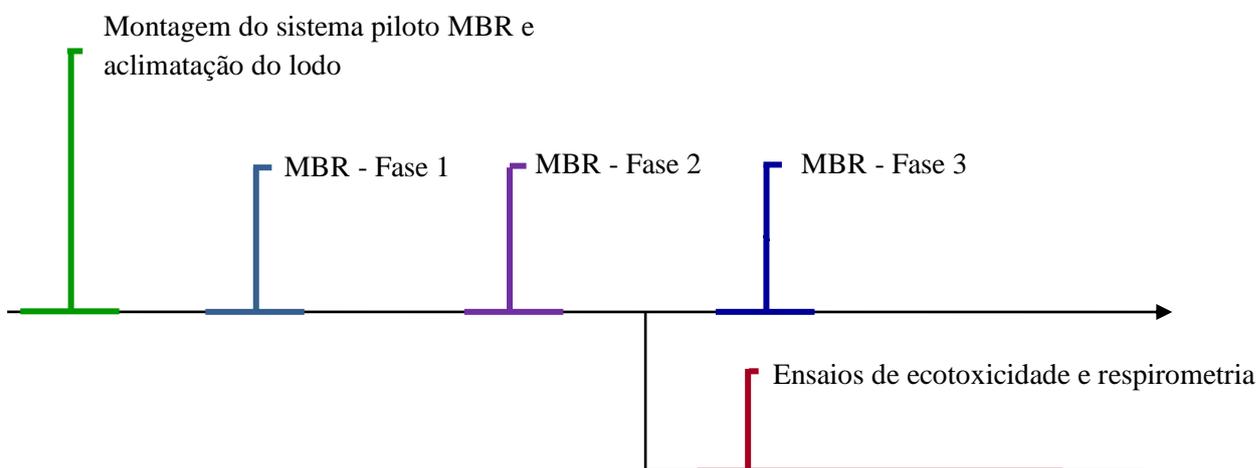
Quando aplicada em sistemas biológicos, a respirometria avalia o metabolismo das bactérias heterotróficas, autotróficas nitrificadoras e autotróficas nitrificadoras. As bactérias autotróficas são responsáveis pela nitrificação no nitrogênio presente no efluente, já as bactérias heterotróficas, além de consumirem o material orgânico, contribuem no processo de desnitrificação no nitrogênio (CAPODICI *et al.*, 2016). Os substratos utilizados para estudar o metabolismo das bactérias heterotróficas devem ser fonte de carbono e, segundo Silva Filho *et al.* (2015), o acetato de sódio ( $C_2H_3NaO_2$ ) exerce maiores taxas de consumo de oxigênio. Já para as autotróficas nitrificadoras e nitrificadoras podem-se utilizar como substrato o cloreto de amônio ( $NH_4Cl$ ) e nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) respectivamente (SILVA FILHO *et al.*, 2015).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1 Delineamento experimental

A Figura 3 mostra uma linha do tempo de como se deu o desenvolvimento das etapas do projeto.

**Figura 3 - Linha do tempo de execução do projeto.**



Fonte: Autora (2018).

O projeto iniciou com a montagem do sistema piloto de biorreator com membranas submersas (MBR) seguida da aclimação do lodo no efluente a ser trabalhado (esgoto sintético). A operação do sistema se deu em três fases cujas características estão mostradas na Tabela 5.

**Tabela 5 – Características das três fases de operação do sistema MBR.**

Fase	Concentração de amoxicilina no efluente bruto ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Vazão de operação ( $\text{L h}^{-1}$ )	TDH (h)	Tempo de operação (dias)
1	0	1	40	40
2	100	1	40	40
3	100	2	20	90

Fonte: Autora (2018).

A primeira fase correspondeu ao sistema controle, que consistiu em avaliar o comportamento do MBR no tratamento do efluente sintético. Nas Fases 2 e 3 foram adicionados  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina ao esgoto bruto. Na terceira fase, a vazão de trabalho foi dobrada visando verificar a resposta do sistema ao receber uma carga maior do composto.

A escolha da concentração de amoxicilina foi baseada na revisão da literatura sobre os níveis encontrados em afluentes de estações de tratamento, conforme consta na Tabela 2. Também foram levadas em consideração as limitações do equipamento LC-MS em quantificar níveis traços do composto. Assim, foi escolhida a concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  do antibiótico, cujo valor já foi encontrado, por exemplo, em afluente de ETEs por Morse e Jackson (2003).

O reator operou com tempo de detenção hidráulica (TDH) elevado, acima do TDH comumente operado em biorreatores, em virtude da baixa biodegradabilidade da amoxicilina. Além disso, a operação do sistema com menores TDH e maiores vazões implicava em maiores consumos de reagentes para a produção do esgoto sintético.

Não foi feito o descarte do lodo durante todo período monitorado, portanto, operou-se com a idade do lodo “infinita”.

O tempo de operação variou conforme a frequência das coletas das amostras para análises de qualidade do tratamento, pois foi determinada uma média de 30 amostragens para a caracterização de cada fase. Enquanto a frequência nas duas primeiras fases foi de cinco amostragens por semana, na terceira foi de apenas três.

Paralelamente ao monitoramento do reator MBR no tratamento do efluente sintético, foram realizados ensaios de ecotoxicidade e de respirometria.

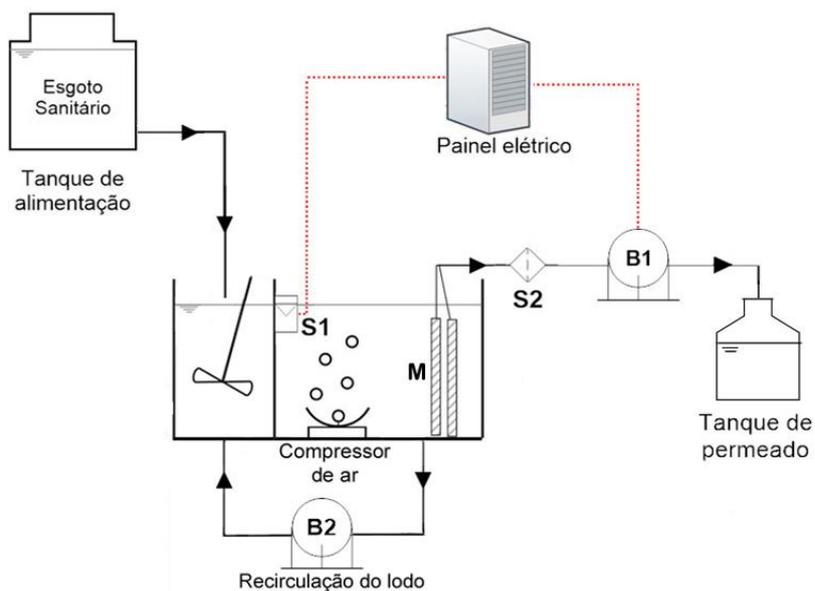
Os testes de ecotoxicidade foram realizados para avaliar a toxicidade do residual de amoxicilina e de seus possíveis produtos de degradação ainda presentes no efluente tratado pelo MBR. Para isso, os organismos-testes utilizados foram: bactérias comumente encontradas no meio ambiente (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*), bactéria luminescente *Vibrio fischeri*, crustáceo *Daphnia magna*, algas unicelulares (*Chrorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata*) e sementes de alface (*Lactuca sativa*) e de mostarda (*Sinapis alba*).

O ensaio de respirometria foi realizado a fim de verificar o efeito inibitório que diferentes concentrações de amoxicilina podem causar nas bactérias heterotróficas presentes no biorreator MBR.

#### 4.2 Montagem do sistema piloto de biorreatores com membranas submersas (MBR)

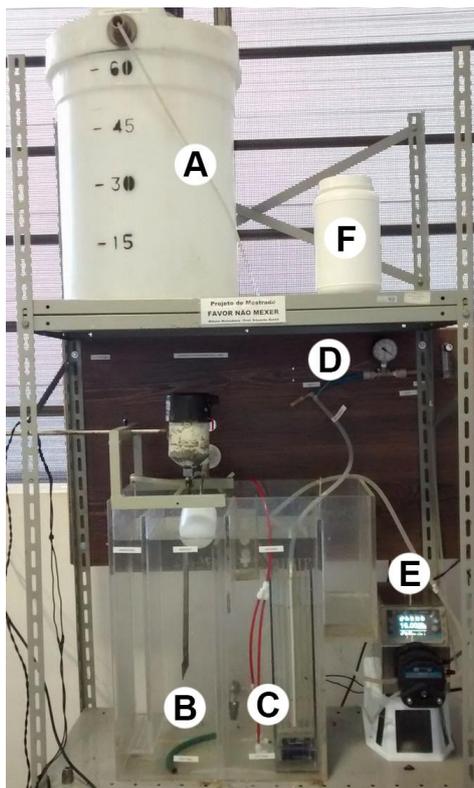
A linha de tratamento foi composta por um biorreator com membranas submersas montado no Laboratório de Processos Biológicos da UFABC, Santo André – SP. O fluxograma está apresentado na Figura 4 e uma foto do sistema piloto de MBR montado é apresentada na Figura 5.

**Figura 4 – Fluxograma do sistema de biorreatores com membranas. S1: sensor de nível; S2: sensor de pressão; B1 e B2: bombas peristálticas; M: membranas.**



Fonte: Autora (2018).

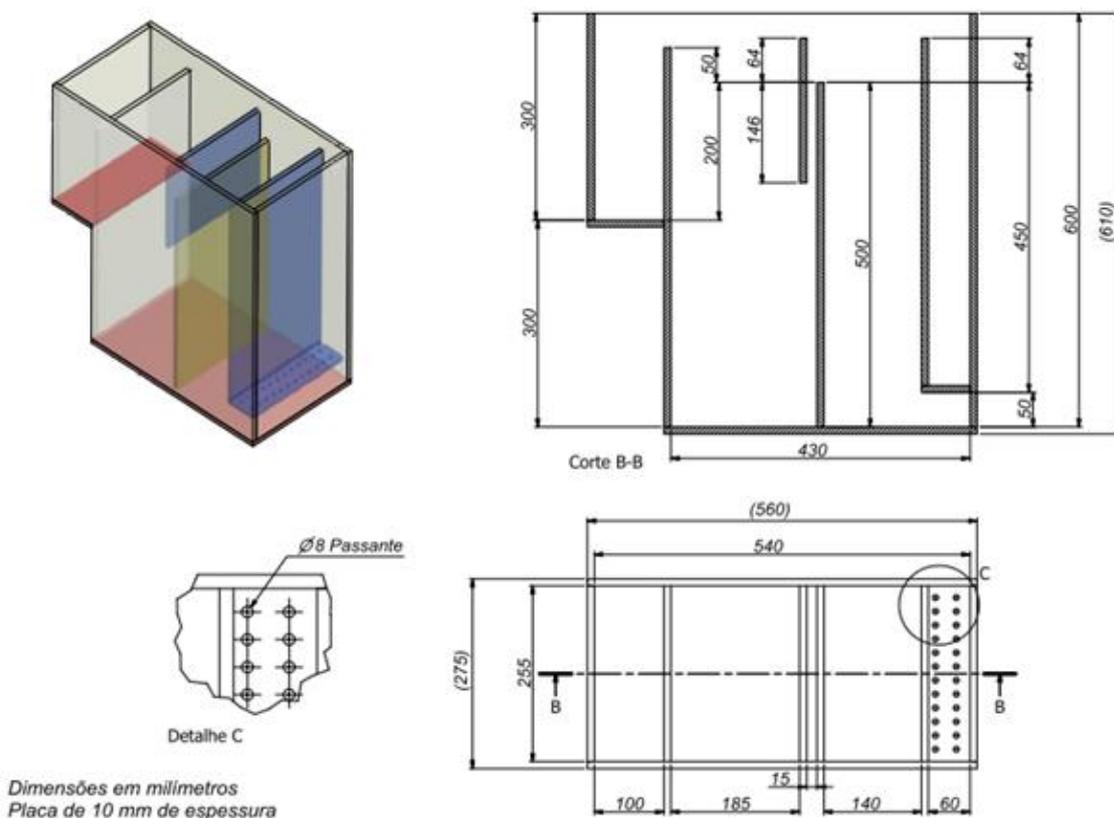
**Figura 5 – Sistema piloto MBR montado: (A) Tanque de alimentação; (B) Zona anóxica do reator com agitador mecânico e mecanismo de boia; (C) Zona aeróbia do reator com cassete de membranas e difusores; (D) Vacuômetro; (E) Bomba peristáltica; (F) Tanque de permeado.**



Fonte: Autora (2018).

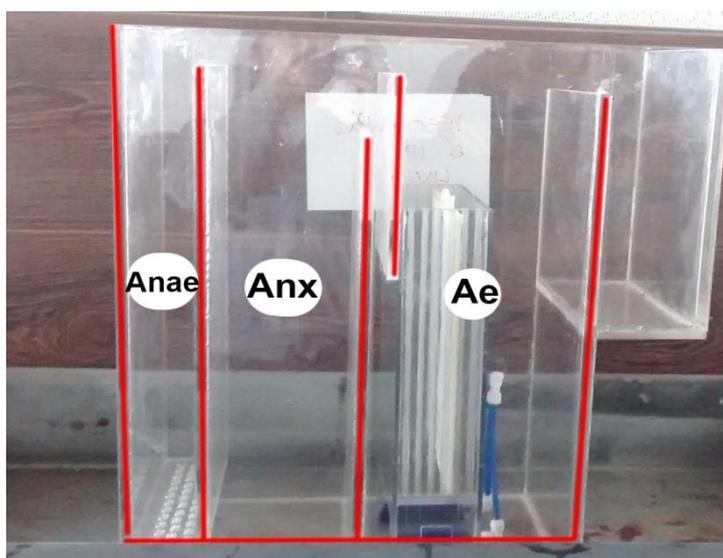
O biorreator foi construído em acrílico de espessura de 10 mm e suas dimensões estão apresentadas na Figura 6. Uma imagem do reator montado está apresentada na Figura 7. O reator foi construído com três câmaras (anaeróbia, anóxica e aeróbia) com o intuito de propor diferentes tratamentos do efluente em projetos futuros. No entanto, a presente pesquisa visa à remoção de nitrogênio, assim, a configuração do biorreator conta apenas com dois compartimentos em seu interior: zonas aeróbia e anóxica, que realizam, respectivamente, o processo de nitrificação e desnitrificação do esgoto. A zona anóxica do reator tem um volume de 18,5 L e a zona aeróbia, 25,0 L.

Figura 6 – Dimensões do reator MBR utilizado no estudo.



Fonte: Autora (2018).

Figura 7 – Foto do biorreator montado: (Ana) Anaeróbia; (Anx) zona anóxica; (Ae) zona aeróbia.



Fonte: Autora (2018).

Foi utilizada uma membrana de ultrafiltração do tipo placa-plana (marca SINAP<sup>®</sup>, modelo SINAP 10). Segundo o fabricante, as membranas foram sintetizadas em fluoreto de polivinilideno (PVDF) e cada placa tem uma porosidade de 0,1  $\mu\text{m}$  (membrana de ultrafiltração), área de 0,1  $\text{m}^2$ , dimensões de 22 x 32 x 0,6 cm (largura x comprimento x

espessura) e pode trabalhar num fluxo de 40 a 60 L peça<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, equivalente a 16,7 a 25 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>.

Para este trabalho, foi determinado que o sistema operasse em fluxo contínuo a uma vazão de 1,0 L h<sup>-1</sup> do permeado nas Fases 1 e 2 e de 2,0 L h<sup>-1</sup> na Fase 3. Assim, foi utilizada uma única placa de membrana nas primeiras fases e duas placas na última para manter o fluxo de permeado na mesma faixa: 10 L h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. A Figura 8 mostra a imagem da membrana de ultrafiltração do tipo placa-plana utilizada.

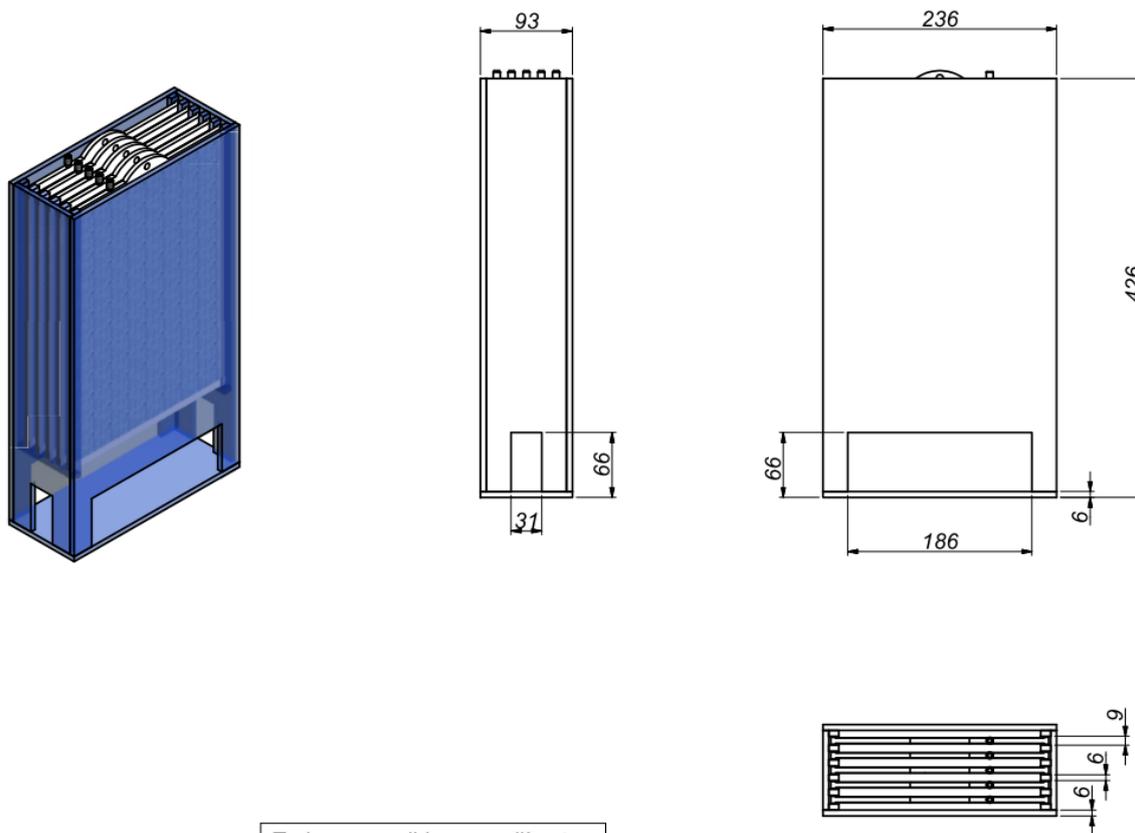
**Figura 8 – Membrana utilizada na piloto de MBR.**



Fonte: Autora (2018).

O cassete é um módulo que agrupa as membranas posicionando-as submersas verticalmente no biorreator. Este foi construído em policarbonato, de 6 mm de espessura, com capacidade para cinco placas de membranas e suas dimensões estão apresentadas na Figura 9.

**Figura 9 – Dimensões do cassete de membranas do MBR.**

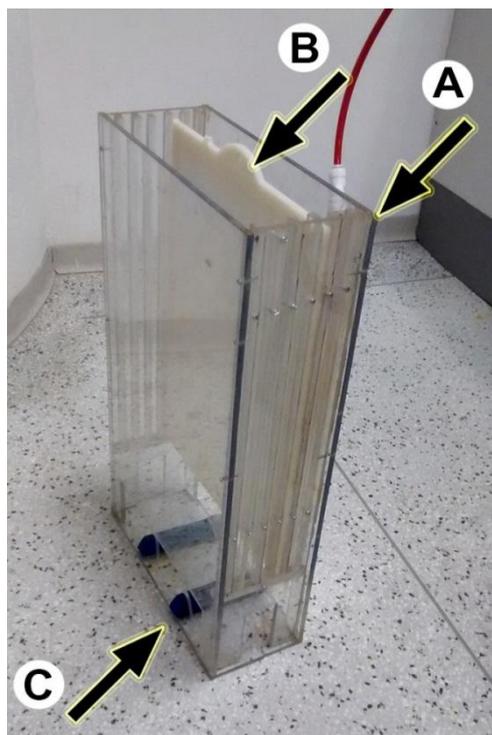


Todas as medidas em milímetros

Fonte: Autora (2018).

No fundo do cassete foram colocados os difusores de ar de pedra porosa (marca VigoAr<sup>®</sup>) para, além de fornecer oxigênio ao lodo e mantê-lo em suspensão na câmara aeróbia, promover um fluxo tangencial de aeração para o processo de filtração e para a limpeza da superfície da membrana, minimizando os efeitos do *fouling*. A Figura 10 mostra a foto do cassete de membranas montado.

**Figura 10 – Foto do cassete de membranas do MBR montado com difusores de ar e membrana: (A) Cassete; (B) Membrana; (C) Difusores de ar.**



Fonte: Autora (2018).

O sistema contava com um tanque de alimentação de polietileno, com tampa, e capacidade de armazenagem para 60 L, posicionado acima do reator. O sistema era alimentado por gravidade e o nível do reator era controlado por uma boia que estava instalada no tanque anóxico. A agitação da câmara anóxica era realizada por um agitador mecânico (marca Fisatom<sup>®</sup>, modelo 713D) na rotação de aproximadamente 150 RPM.

A sucção do permeado e a recirculação do lodo para a zona anóxica era feita por uma bomba peristáltica de cabeçote duplo (marca Ms Tecnopon<sup>®</sup>, modelo DMC 300L), que devido ao diâmetro das mangueiras utilizadas garantia uma recirculação de lodo para a zona anóxica de aproximadamente 3 vezes a vazão de permeado. Além disso, para controle físico do *fouling*, o sistema foi operado com ciclos de 20 minutos de sucção e 2 minutos de pausa a fim de proporcionar o relaxamento.

O sistema também conta com sensores de nível e de pressão transmembrana. O sensor de nível está posicionado dentro do biorreator, na zona aeróbia, e é intertravado com a bomba peristáltica que realiza a sucção do permeado, funcionando como um sistema de segurança: caso baixe o nível do tanque, o sensor desliga a bomba do permeado de forma a evitar que a membrana fique exposta ao ar. Além disso, foi utilizado um vacuômetro (marca Polimediação<sup>®</sup>) para monitorar a pressão transmembrana (PTM), tendo sido estabelecido um

valor máximo de operação de 0,1 bar, para evitar a colmatção na membrana. Quando a PTM alcançava este valor, era realizada a limpeza química de recuperação de fluxo.

A limpeza química consistiu em retirar a membrana do módulo (pausando o tratamento ou trocando a membrana) e submergindo-a em uma solução de 200 mg L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sódio por 8 horas.

### 4.3 Preparo do efluente sintético

O tratamento por MBR foi realizado com um efluente sintético a fim de reduzir a variabilidade da composição do efluente e monitorar a variação da concentração de matéria orgânica, nutrientes, sais e micronutrientes e melhor avaliar o sistema MBR no processo de remoção da amoxicilina. Dessa forma, foi produzido um efluente sintético de características análogas ao esgoto doméstico para estudar o comportamento do composto no sistema de tratamento e o efeito na matriz.

A composição do esgoto sintético utilizada (Tabela 6) foi baseada em Torres (1992) e adaptada por Michelan (2006) para obter 800 mg L<sup>-1</sup> de Demanda Química de Oxigênio (DQO); as fontes de nitrogênio e potássio foram adaptadas de Souza (2011) de forma a obter uma relação de concentração DQO:N:P de 100:5:1 (no caso, 800:40:8); os micronutrientes necessários para a manutenção da microbiota presente no biorreator e os sais foram baseados em Michelan (2006) e em Van Loosdrecht *et al.* (2016).

Tabela 6 – Composição do esgoto sintético utilizado no presente trabalho.

Classificação do composto	Composição	Concentração teórica (mg L <sup>-1</sup> )	Classificação do composto	Composição	Concentração teórica (mg L <sup>-1</sup> )
Carboidratos (40% DQO)	Sacarose	56	Sais e micronutrientes	EDTA	30
	Celulose	54,4		FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,5
Proteínas (50% DQO)	Extrato de carne	332,8		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,45
Lipídeos (10% DQO)	Óleo de soja	81,6		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,09
Tampão	NaHCO <sub>3</sub>	320		MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,36
Fonte de nitrogênio	NH <sub>4</sub> Cl	153		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,18
Fonte de fósforo	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	36		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,36
Sais e micronutrientes	NaCl	250		KI	0,54
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	7		CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,45
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,5			

Fonte: Adaptado de TORRES (1992) *apud* MICHELAN (2006); SOUZA (2011); VAN LOOSDRECHT *et al.* (2016)

O preparo do efluente sintético consistiu em produzir inicialmente uma solução 50 vezes concentrada e realizar diluições, a partir de alíquotas, para obter a concentração teórica indicada na Tabela 6.

#### 4.4 Aclimação, partida e estabilização do sistema de MBR

O lodo utilizado no presente sistema foi originalmente coletado (8 L) de um MBR já em operação, montado no Centro Internacional de Referência em Reúso de Água (CIRRA) da Universidade de São Paulo (USP), alimentado pelo esgoto da moradia estudantil e do restaurante universitário do campus.

Primeiramente, foi feita a aclimação do lodo com o efluente sintético, em um reator cilíndrico aeróbio, de aeração contínua, durante um mês (Figura 11). A alimentação foi realizada em batelada, com o desligamento da aeração, sedimentação do lodo e troca do sobrenadante (aproximadamente 12 L), utilizando efluente sintético na concentração teórica da Tabela 6, duas vezes ao dia.

**Figura 11 – Aclimação do lodo de MBR em efluente sintético.**



Fonte: Autora (2018).

Após o período, o lodo foi transferido para o MBR, dando partida ao sistema e iniciando a fase de estabilização com o monitoramento dos parâmetros de remoção de DQO e de desenvolvimento do lodo pela análise de sólidos suspensos totais (SST). Determinou-se como o final da fase de estabilização quando a concentração do lodo aumentasse e estabilizasse. Isso aconteceu cerca de um mês após o início da operação, com uma concentração de cerca  $3.000 \text{ mg L}^{-1}$  de SST.

#### 4.5. Monitoramento de parâmetros de controle do sistema MBR

Para avaliação da performance do sistema, ambas as zonas do biorreator (anóxica e aeróbia) foram avaliadas quanto à concentração de sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV), temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e pH. Os ensaios de sólidos SST e SSV foram realizados com base no método 2540 do APHA (2016). Para isso, foram coletadas, em duplicata, amostras de lodo das zonas aeróbia e anóxica e analisadas imediatamente após a coleta e, ao final, foi feita uma média ponderada pelo volume para ambas as zonas do reator. A temperatura e o OD foram medidos utilizando uma sonda da Thermo Scientific® (modelo Orion Star A123), e o pH foi medido por um pHmetro da Nova®.

A partir desses parâmetros de controle, foram calculados o tempo de detenção hidráulica (TDH) (Equação 3), que determina o tempo que o efluente permanece no biorreator para ser tratado, a relação alimento/microrganismo (A/M) (Equação 4) e a carga orgânica volumétrica (COV) (Equação 5), para verificar a quantidade de alimento fornecida para as bactérias.

$$TDH = \frac{V}{Q} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde,

- TDH: tempo de detenção hidráulica (h);
- V: volume do reator (L)
- Q: vazão (L h<sup>-1</sup>);

$$A/M = \frac{Q \times C_{DQO}}{V \times X_{SSV}} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde,

- A/M: Relação alimento/microrganismo (kg<sub>DQO</sub>/kg<sub>SST</sub>.dia);
- Q: vazão (L h<sup>-1</sup>);
- C<sub>DQO</sub>: concentração de DQO (mg L<sup>-1</sup>);
- V: volume do reator (L);
- X<sub>SSV</sub>: Concentração de sólidos suspensos totais (mg L<sup>-1</sup>).

O sistema MBR operou com a idade do lodo “infinita”, pois não houve necessidade de se fazer o descarte do lodo, uma vez que este se manteve estável durante todo o período de operação.

No processo de separação por membranas monitorou-se a pressão exercida na membrana (pressão transmembrana) com o objetivo de evitar a formação de depósitos

irreversíveis e conseqüentemente diminuir a permeabilidade. Essa medida foi realizada manometricamente, observando o vacuômetro instalado no sistema.

O fluxo do permeado foi calculado com base na Equação 5 e corrigida para a temperatura de 20 °C conforme a Equação 6 (JUDD, 2011).

$$J_T = \frac{Q_p}{A_m} \quad (\text{Equação 5})$$

$$J_{20^\circ\text{C}} = \frac{J_T}{1,025^{T-20}} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde,

- $J_T$ : fluxo de permeado na temperatura monitorada ( $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ );
- $J_{20^\circ\text{C}}$ : fluxo de permeado na temperatura corrigida para 20 °C ( $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ );
- $Q_p$ : vazão ( $\text{L h}^{-1}$ );
- $A_m$ : área de membrana ( $\text{m}^2$ ).

A permeabilidade foi determinada pela razão entre o fluxo corrigido e a pressão transmembrana (PTM) (Equação 7).

$$P = \frac{J_{20^\circ\text{C}}}{PTM} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde,

- P: permeabilidade ( $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$ );
- J: fluxo de permeado ( $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ );
- PTM: pressão transmembrana (bar)

A permeabilidade é a relação entre o fluxo e a pressão transmembrana e mostra que uma redução da permeabilidade da membrana está associada, geralmente, à formação de depósitos na superfície da mesma e à ocorrência do *fouling*.

#### 4.6 Coleta, preparo e caracterização das amostras de afluente e efluente

Para todas as fases de operação do sistema, os efluentes foram caracterizados antes e após os processos de tratamento por MBR. As amostras de afluente e de efluente tratado (1,0 L de cada) foram coletadas em duplicata cinco vezes por semana e armazenadas diretamente em frascos de polipropileno, descontaminados previamente com HCl 10% (v/v) e lavados com água destilada.

Medições de cor, turbidez, condutividade elétrica, pH, alcalinidade e DQO foram realizadas logo após a coleta sem filtração da amostra. Frações das amostras foram armazenadas sob congelamento para posterior determinação da série nitrogenada e fósforo

total. Outra fração foi filtrada em filtro Millipore® (acetato de celulose, 47 mm diâmetro, 0,45 µm de porosidade) para a análise posterior de carbono orgânico dissolvido (COD). As metodologias de análise utilizadas estão indicadas na Tabela 7.

Durante as Fases 2 e 3, foi adicionada uma concentração 100 µg L<sup>-1</sup> do antibiótico amoxicilina (Sigma-Aldrich) no efluente sintético antes de passar pelo sistema MBR através de uma derivação em linha utilizando a bomba peristáltica para a propulsão. A coleta da amostra e a extração da amoxicilina foram realizadas no mesmo dia da coleta, empregando cartuchos de extração em fase sólida (SPE) devidamente acondicionados.

**Tabela 44 – Parâmetros analíticos avaliados e as respectivas metodologias de análise.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Método de Referência</b>
pH	Potenciométrico
Cor	Colorimétrico
Turbidez	Nefelométrico
Condutividade elétrica	Condutométrico
Alcalinidade	APHA (2016), 2320 B
DQO	APHA (2016), 5220 B
COD	Total Organic Carbon Analyser
N-Total	Total Organic Carbon Analyser
N-NKT	APHA (2016), 4500-N <sub>org</sub> B
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	APHA (2016), 4500-NH <sub>3</sub> B/C
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> e N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cromatografia de íons
P-Total	APHA (2016), 4500-P E
Amoxicilina	LC-MS

Fonte: Autora (2018).

A matéria orgânica foi monitorada por duas variáveis no sistema: demanda química de oxigênio (DQO) e carbono orgânico dissolvido (COD). Não foi feito o acompanhamento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) devido a problemas enfrentados com a incorporação de sementes para a realização do ensaio (método 5210 do Standard Methods – APHA, 2016). Testes realizados usando o lodo do próprio MBR como inóculo não apresentaram resultados coerentes (razão DBO/DQO = 0,5). Assim, a variável principal de monitoramento da matéria orgânica foi a DQO, que também foi utilizada como base para dimensionar o reator.

#### **4.7 Análise cromatográfica**

Testes preliminares com diferentes composições de fase extratora (PDVB, marca Phenomenex, modelo Strata<sup>TM</sup>-X 33 e C<sub>18</sub>, marca Phenomenex, modelo Strata<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub> E) e de

massa de substrato (200 e 500 mg, 6 mL) foram realizados para avaliar a melhor composição de fase extratora.

A passagem da amostra pelo cartucho foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica (marca Tecnopon<sup>®</sup>, modelo DMC 300L) sob vazão de 3,0 mL min<sup>-1</sup>. Após a extração, os cartuchos foram armazenados protegidos da luz e sob resfriamento até a eluição e análise por cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massas (LC-MS). Também com o auxílio da bomba peristáltica a 3,0 mL min<sup>-1</sup>, as amostras foram eluídas em 12 mL de acetonitrila e evaporadas em atmosfera inerte para pré-concentração dos analito (GOZLAN *et al.*, 2013). Em seguida, foi feita a ressuspensão da amostra em 1 mL de acetonitrila grau HPLC antes das análises por LC-MS.

As determinações de concentração de amoxicilina e de potenciais subprodutos de degradação ou conversão foram realizadas empregando-se um cromatógrafo líquido (marca Agilent<sup>®</sup>, modelo 1200 Infinity) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (marca Agilent<sup>®</sup>, modelo 6130), disponível na Universidade Federal do ABC. A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna C<sub>18</sub> (Zorbax Eclipse Plus, 100 mm x 4,6 mm x 3,5 µm, Agilent) com uma vazão constante da fase móvel de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. A fase móvel consistiu de acetonitrila (+ 0.1% v/v ácido fórmico) e água (+ 0.1% v/v ácido fórmico) em regime isocrático (65:35, v/v). A temperatura da coluna foi mantida em 25 °C e o volume de injeção foi de 20 µL.

Após a separação cromatográfica, a fase móvel contendo os analitos foi submetida à etapa de ionização por eletronebulização. A fonte de ionização foi operada no modo positivo a uma voltagem de 4000 V. Gás nitrogênio, produzido por meio da vaporização de N<sub>2</sub> líquido, foi utilizado como gás de arraste e secagem a uma vazão de 10 L min<sup>-1</sup> e a 350 °C. A pressão do N<sub>2</sub> no nebulizador foi fixada em 35 psi (GOZLAN *et al.*, 2013).

A amoxicilina foi identificada e quantificada empregando-se o método de calibração externa, cuja faixa de calibração variou de 1 a 1000 µg L<sup>-1</sup>.

#### **4.8 Mecanismos de remoção de amoxicilina pelo MBR**

Para avaliar a capacidade de remoção do antibiótico pelos mecanismos do sistema MBR, foram feitos ensaios em duplicata para cada processo envolvido.

A determinação da parcela da concentração de amoxicilina adsorvida no lodo e disponível para biodegradação foi realizada pela extração líquida pressurizada, conforme descrito por Radjenović *et al.* (2009). O método consistiu em coletar 200 mL do lodo do reator da zona aeróbia, extrair no cartucho (marca Phenomenex, modelo Strata<sup>TM</sup>-X 33 µm Polymeric Reversed Phase) e analisar segundo a metodologia de LC-MS descrita acima. O

procedimento de coleta do lodo do reator seguida da extração foi realizado dessa maneira porque o sistema MBR era alimentado continuamente com efluente sintético dopado com o antibiótico amoxicilina.

Para avaliar a atuação do biofilme formado pelo lodo na superfície da membrana, aplicou-se uma vazão  $1 \text{ L h}^{-1}$  com o auxílio de uma bomba peristáltica (marca Ms Tecnopon<sup>®</sup>, modelo DMC 300L) e coletou-se 500 mL do permeado, que foi extraído analogamente em cartucho e analisado por LC-MS. Posteriormente, realizou-se a limpeza da membrana removendo todo o biofilme formado, e repetiu-se o procedimento.

A quantidade hidrolisada do antibiótico foi verificada dispondo, em um béquer, 1000 mL de efluente sintético ( $\text{pH} = 7$ ) com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina e deixado em repouso por 48 hora hydr. Posteriormente, o volume dessa amostra foi extraído em cartucho e analisado por LC-MS.

O processo de separação por membranas considera a massa molar de corte das membranas utilizadas, no caso, de ultrafiltração (100 kDa) (TAMBOSI, 2010). A massa molar da amoxicilina é  $365,4 \text{ g mol}^{-1}$  (ou 0,365 kDa), ou seja, a molécula é capaz de atravessar a membrana.

A partir da premissa de que o reator foi alimentado com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina, sabendo a concentração que continua no permeado (efluente tratado), e tendo os valores da concentração do antibiótico presente no lodo, da atuação do biofilme, a fração do composto hidrolisada e a porcentagem adsorvida no lodo e disponível para biodegradação, é possível montar um balanço, conforme Equação 8.

$$\text{Afluente} = \text{adsorvido no lodo e disponível para biodegradação} + \text{atuação do biofilme} + \text{hidrólise} + \text{permeado} + \text{parcela biodegradada} + \text{contribuições não quantificadas}$$

(Equação 8)

Existem algumas contribuições que não são quantificadas relacionadas à parcela biodegradada e possíveis perdas, volatilização, entre outros.

#### 4.9 Ensaios ecotoxicológico

Os ensaios ecotoxicológicos ocorreram com amostras provenientes do sistema MBR, afluente e efluente tratado durante as Fases 2 e 3, para avaliar a toxicidade do residual da amoxicilina e de seus possíveis produtos de degradação.

Os ensaios testaram organismos alvo com diferentes níveis tróficos e, portanto, com diferentes complexidades biológicas. Assim, foram utilizadas a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (para toxicidade aguda), o crustáceo *Daphnia magna* (também para toxicidade

aguda), as algas *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata* (para toxicidade em organismos unicelulares), sementes de alface *Lactuca sativa* e de mostarda *Sinapis alba* (para toxicidade em organismos vegetais mais complexos, mas em fase de desenvolvimento embrionário) e as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*.

#### 4.9.1 Ensaio com *Vibrio fischeri*

O organismo usado nas análises de ecotoxicidade aguda foi *Aliivibrio fischeri* (usualmente conhecido por *Vibrio fischeri*, mas reclassificado por Urbanczyk *et al.* (2007)), de linhagem NRRL B-11177, é uma bactéria marinha, halófila, anaeróbia facultativa, gram-negativa, em forma de bastão, flagelada e não patogênica (ABBAS *et al.*, 2018). Foram utilizadas bactérias luminescentes liofilizadas “BioFix<sup>®</sup> Lumi Medium for freeze-dried luminescent bacteria” ressuspendidas, seguindo as instruções do fabricante, com a solução “BioFix<sup>®</sup> Lumi Reconstitution solution”, ambas da empresa Macherey-Nagel GmbH & Co. KG.

A solução *ISO water* (2 mmol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 0,8 mmol L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> e 0,08 mmol L<sup>-1</sup> de KCl) foi empregada como controle negativo e uma solução de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a 50 mg L<sup>-1</sup>, como controle positivo. O controle *ISO water* corresponde a uma solução baseada na OECD 202 que garante as condições mínimas de crescimento de todos os organismos ou das comunidades de microrganismos avaliados nos testes ecotoxicológicos.

Utilizou-se para o ensaio uma incubadora a 15 °C (marca Techne<sup>®</sup>, modelo FBLOCKICE) e um luminômetro (marca Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., modelo BioFix<sup>®</sup> Lumi-10). Os testes foram feitos com amostras em triplicata e, por se trabalhar com bactérias marinhas, a salinidade de todas as amostras e soluções controles precisou ser corrigida com 2% (m/V) de NaCl para compatibilização de matriz.

Inicialmente, foram colocados 100 µL da bactéria em *vials* de vidro de 4,0 mL e incubados por 15 minutos a 15 °C e, então, realizada a leitura inicial da intensidade de luminescência no luminômetro. Em seguida, foram transferidos 900 µL das amostras e dos controles positivo e negativo para os *vials*, os quais foram mantidos na incubadora até o momento da leitura final. Para verificar a luminescência ao longo do tempo, as leituras finais foram realizadas após 15 e 30 minutos da exposição das bactérias às amostras.

Utilizou-se o resultado do controle negativo (*ISO water*) para calcular o fator de correção (Equação 9) referente ao desenvolvimento do organismo. O teste é considerado válido se, após 30 min de incubação, o fator de correção estiver entre 0,6 e 1,8 e o desvio padrão não ultrapassar 5%.

$$F_{kt} = \frac{I_{30}}{I_0} \quad \text{(Equação 9)}$$

Sendo:

- $F_{kt}$ : fator de correção (adimensional);
- $I_{30}$ : luminescência em 30 minutos (URL = Unidades Relativas de Luminescência);
- $I_0$ : luminescência inicial (URL).

Calculou-se também a relação entre a luminescência final e inicial de cada amostra, corrigida com o fator de correção (Equação 10).

$$H_t = \frac{I_{30}}{(I_0 \times F_{kt})} \quad \text{(Equação 10)}$$

Em que:

- $H_t$ : relação entre a luminescência final e inicial (adimensional);
- $I_{30}$ : luminescência em 30 minutos (URL);
- $I_0$ : luminescência inicial (URL);
- $F_{kt}$ : fator de correção (adimensional).

Tendo calculado a média das replicatas, estimou-se a porcentagem de inibição em relação ao sistema controle (Equação 11). Foi utilizado como controle de referência o teste utilizando água deionizada.

$$\text{Inibição} = \frac{(H_{t_{\text{controle}}} - H_{t_{\text{amostra}}})}{H_{t_{\text{controle}}}} \times 100 \quad \text{(Equação 11)}$$

Onde:

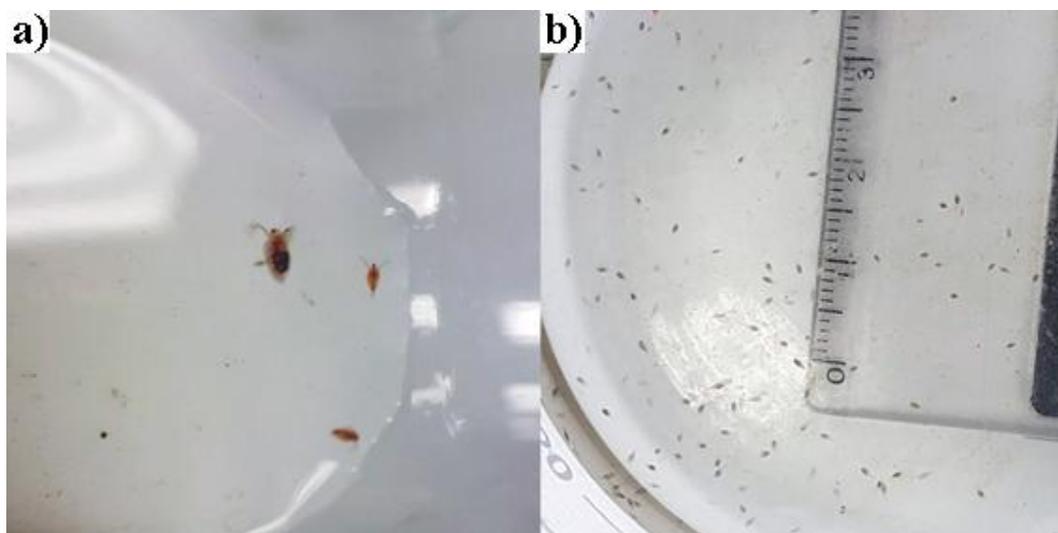
- Inibição: Inibição da luminescência da amostra em relação ao sistema controle (%);
- $H_{t_{\text{controle}}}$ : relação entre a luminescência final e inicial do sistema controle (adimensional);
- $H_{t_{\text{amostra}}}$ : relação entre a luminescência final e inicial da amostra (adimensional);

O teste é considerado válido se o controle positivo causar de 20 a 80 % de inibição após 30 minutos de exposição.

#### 4.9.2 Ensaio com *Daphnia magna*

O ensaio de toxicidade crônica seguiu o protocolo de OECD 202 (2004) para o teste de imobilização utilizando *Daphnia magna* neonatas, ou seja, nascidas em até 24 h (Figura 12).

Figura 12 – *Daphnia magna*: (A) Organismo adulto; (B) Organismos neonatos.



Fonte: Autora (2018).

Os testes foram feitos em quadruplicatas, utilizando erlenmeyers de 100 mL, aos quais se adicionaram 10 mL da amostra saturada em oxigênio e 5 organismos vivos neonatos. Posteriormente, os frascos foram levados a uma incubadora (marca IKA<sup>®</sup>, modelo KS 4000 ic control) a 20 °C e sob agitação de 60 RPM. Após 48 h, foi observada a quantidade de *Daphnia magna* imobilizadas. Eram considerados imobilizados os organismos que não se moviam dentro de 15 segundos após uma leve agitação do frasco. Ao final, calculou-se a porcentagem dos organismos imobilizados frente à quantidade inicial.

#### 4.9.3 Ensaio com as algas *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata*

O ensaio de algas foi adaptado de OECD 201 (2002) com as espécies de algas unicelulares *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata* crescidas após 72 h.

O experimento se deu em quadruplicata, expondo, inicialmente,  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> em 10 mL de amostra acondicionada em frascos erlenmeyer de 25 mL, e deixadas na incubadora (marca Weiss, modelo WK111 340) nas condições ideais para seu crescimento: temperatura de 21 °C, umidade do ar de 50%, luminosidade de 3500 lux e agitação de 120 RPM (Adaptado de OECD 201; 2002). Para garantir que qualquer inibição do crescimento das algas seja devida apenas à presença dos fármacos e não à falta de alimento, nutrientes (Tabela 8) foram adicionados às amostras oriundas do MBR e ao sistema controle de água deionizada.

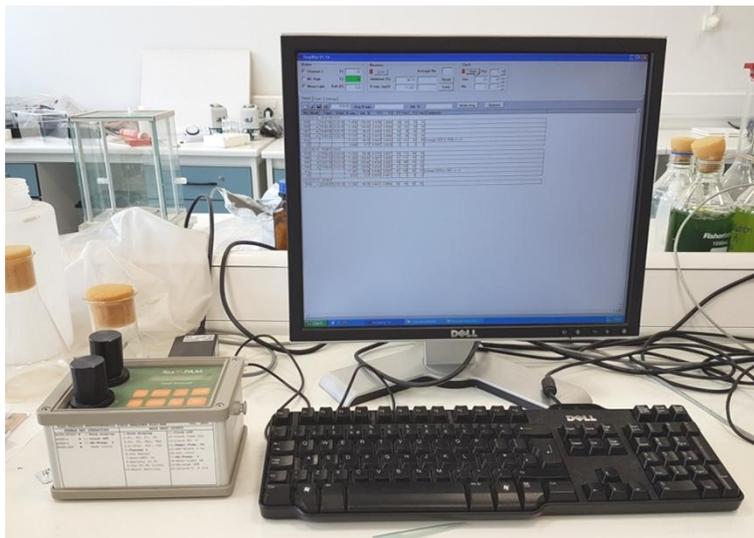
**Tabela 7 - Nutrientes adicionados às amostras do ensaio ecotoxicológicos com algas.**

<b>Composição</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	20,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50,0
NaHCO <sub>3</sub>	15,9
EDTA FeNa	2,25
EDTA Na <sub>2</sub>	2,25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,39
(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,0
Cianocobalamina (vitamina B12)	0,04
Thamina (Vitamina B1)	0,04
Biotina	0,04
NaNO <sub>3</sub>	80,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	36,0

Fonte: CCAP – Jaworski's Medium (2014)

Após 24, 48, 72 e 96 horas, foram medidas a atividade fotossintética e a concentração de células nos ensaios. Para medir a atividade fotossintética foi utilizada um analisador da capacidade energética do canal de clorofila das algas (Marca WALZ Mess und Regeltechnik, modelo ToxY-PAM) acoplado a um computador com o software ToxyWin V1.14, conforme mostra a Figura 13. A contagem das unidades de células por mL em amostras biológicas foi medida utilizando o contador de células automatizado para microscópios (marca CELEROMICS<sup>®</sup>, modelo Micro Counter 1100) e microscópio com objetiva de 20x, mostrado na Figura 14.

**Figura 13 – Analisador de atividade fotossintética.**



Fonte: Autora (2018).

**Figura 14 – Contador de células.**



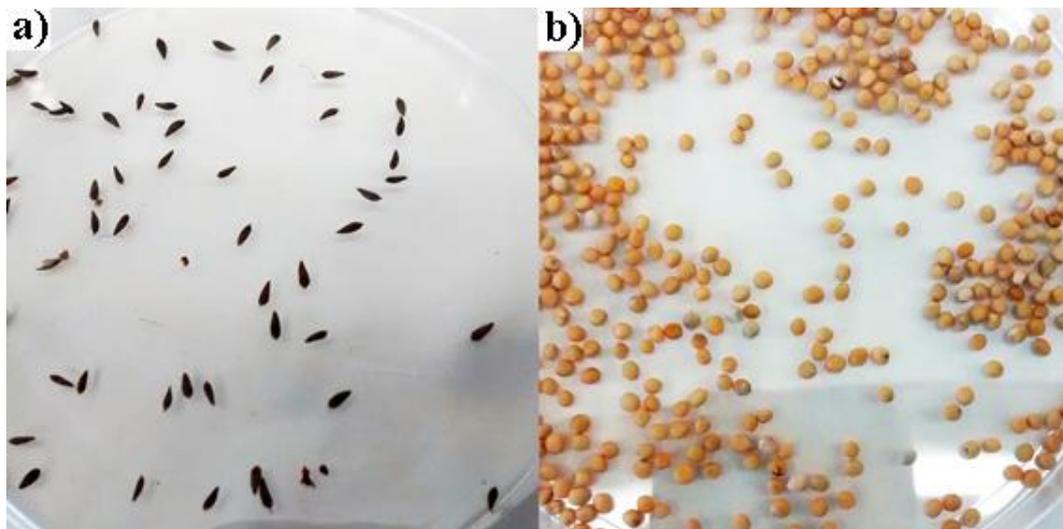
Fonte: Autora (2018).

Calculando-se as médias das concentrações de células e da atividade fotossintética, foi possível montar gráficos para observar a cinética de crescimento e desenvolvimento das algas.

#### **4.9.4 Ensaio com sementes de alface (*Lactuca sativa*) e mostarda (*Sinapis alba*)**

As sementes utilizadas no ensaio foram de alface (do tipo “*Lettuce buttercrunch*”, espécie *Lactuca sativa*, lote 436516) e mostarda (do tipo “*Mustard white*”, espécie *Sinapis alba*, lote 437511), ambas da empresa *Dobies of Devon*, mostradas na Figura 15. As sementes avariadas foram previamente descartadas para não serem aproveitadas no ensaio.

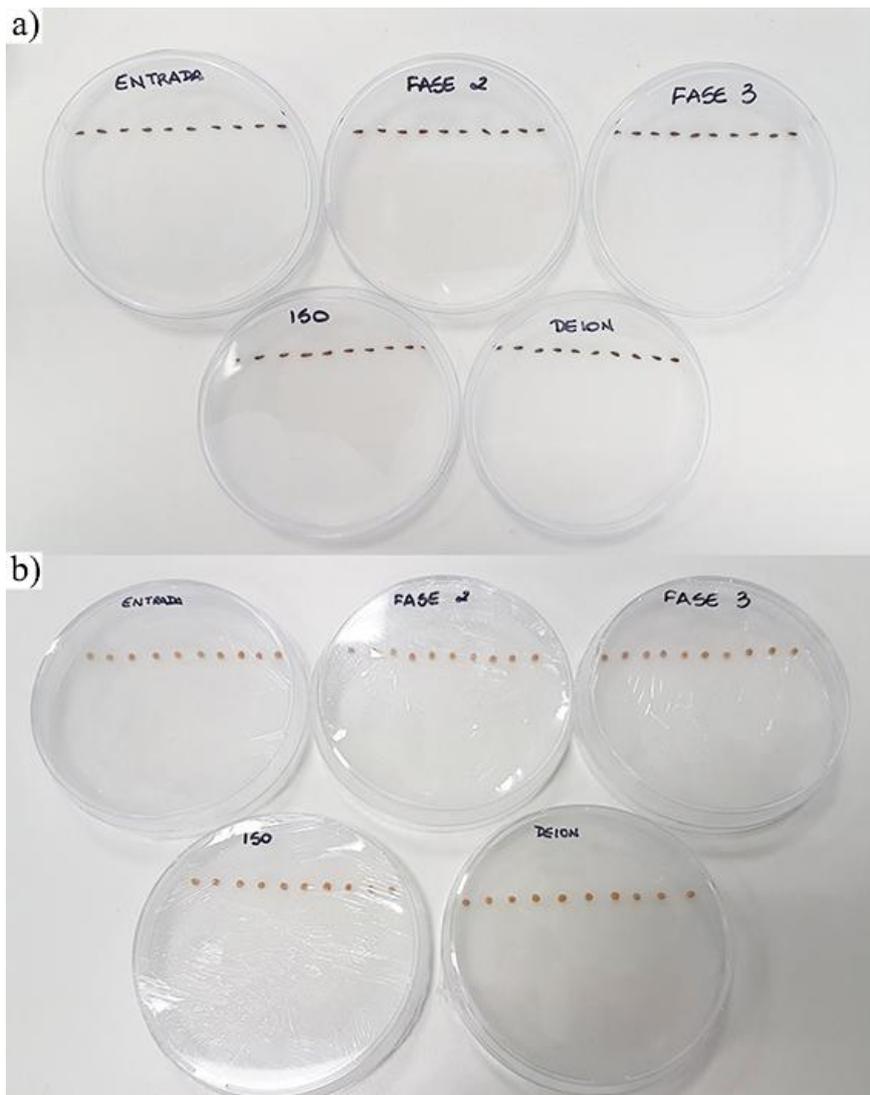
**Figura 15 – Sementes utilizadas no teste de toxicidade por germinação: (A) Alface; (B) Mostarda.**



Fonte: Autora (2018).

O ensaio foi adaptado de USEPA (1989). Os testes foram feitos em triplicata, usando placas de Petri (90 mm de diâmetro) cobertas com papéis absorventes (em inglês, chamado de “*blotting paper*”), gramatura  $300 \text{ g m}^{-2}$ , previamente cortados em círculos. Em cada placa, foram adicionados 4,0 mL da amostra e aguardado um período para que todo o papel absorvesse completamente o líquido. Em seguida, 10 sementes foram dispostas em linha reta a  $3/4$  na placa de Petri, que foram devidamente identificadas, embaladas em filme PVC (Figura 16) e colocadas na incubadora (marca Binder®, modelo BD 23) em uma posição semi-vertical (Figura 17). A germinação ocorreu sob condições de escuridão a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . O tempo de incubação dependeu das características de cada semente, sendo 96 h para alface e 48 h para a mostarda.

Figura 16 – Início do teste de germinação. Sementes dispostas na placa de Petri: (A) Alfafa; (B) Mostarda.



Fonte: Autora (2018).

Figura 17 - Placas de Petri posicionadas na incubadora



Fonte: Autora (2018).

Após a incubação, as sementes foram analisadas segundo três variáveis: (1) porcentagem de sementes geminadas, (2) comprimento total dos brotos e (3) comprimento da raiz. O comprimento total e da raiz foram medidos usando um paquímetro de 150 mm (resolução 0,02 mm).

Foram analisados os parâmetros de porcentagem de germinação (Equação 12) e porcentagem de inibição do comprimento total e da raiz (Equação 13). A porcentagem de germinação foi baseada em Ghava (2015):

$$\% \text{ Germinação} = \frac{\text{quantidade de sementes que germinaram}}{\text{número total de sementes}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

As porcentagens de inibição do comprimento total foram determinadas em um cálculo análogo ao da raiz, que foi baseado em Clesceri *et al.* (1998).

$$\text{Inibição da raiz} = \frac{Lc-Ls}{Lc} \times 100 \quad (\text{Equação 13})$$

Sendo,

- Lc: média do comprimento da raiz no controle de referência (mm);
- Ls: média do comprimento da raiz na amostra teste (mm).

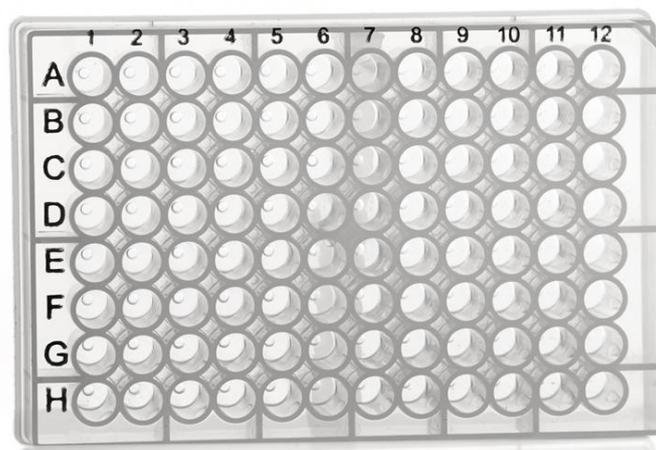
#### 4.9.5 Ensaio com as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*

O ensaio iniciou com o preparo das bactérias utilizando culturas axênicas crescidas em 72 h de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*. Para isso, promoveu-se o crescimento das bactérias em meio de cultura (*Luria Bertani*, composição: 10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g L<sup>-1</sup> NaCl) deixando 24 horas em incubadoras (marca Binder®, modelo BD 23) à temperatura de 37 °C para *Escherichia coli* e 25 °C para *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*. Após o período, cada cultura foi separada do meio usando uma centrífuga (marca Sanyo®, modelo MSE Micro Centaur) a 1600 RPM e ressuspendida em solução PBS (do inglês “*Phosphate-Buffered Saline*”, composição: 0,2 g L<sup>-1</sup> de KCl, 0,2 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,0 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 1,15 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) com o auxílio de um vortex (marca SciQuip®, modelo Vortex VariMix), de forma a cessar o crescimento das culturas e manter o pH em 7,4.

Um volume de 170 µL das amostras oriundas do MBR, do controle de referência com água deionizada, do controle negativo *ISO water* (2 mmol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de

MgSO<sub>4</sub>, 0,8 mmol L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> e 0,08 mmol L<sup>-1</sup> de KCl) e do controle positivo K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (50 mg L<sup>-1</sup>) foram colocados em microplacas de 96 poços (Figura 18) juntamente com 10 µL das bactérias ressuspendidas em PBS. Foi utilizada uma microplaca para cada espécie de bactéria a fim de se evitar contaminação. Foram realizadas as leituras das placas em um espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek Instruments<sup>®</sup>, modelo ELx808) acoplado a um computador com o software Gen5 da Biotek Instruments<sup>®</sup> (Figura 19) nos comprimentos de onda 405, 570 e 630 nm. Em seguida, as placas foram levadas à incubadora por 24 horas, respeitando a temperatura de incubação para o crescimento de cada organismo.

**Figura 18 - Imagem de microplaca de 96 poços.**



Fonte: 4titude (2017)

**Figura 19 - Espectrofotômetro para microplacas.**

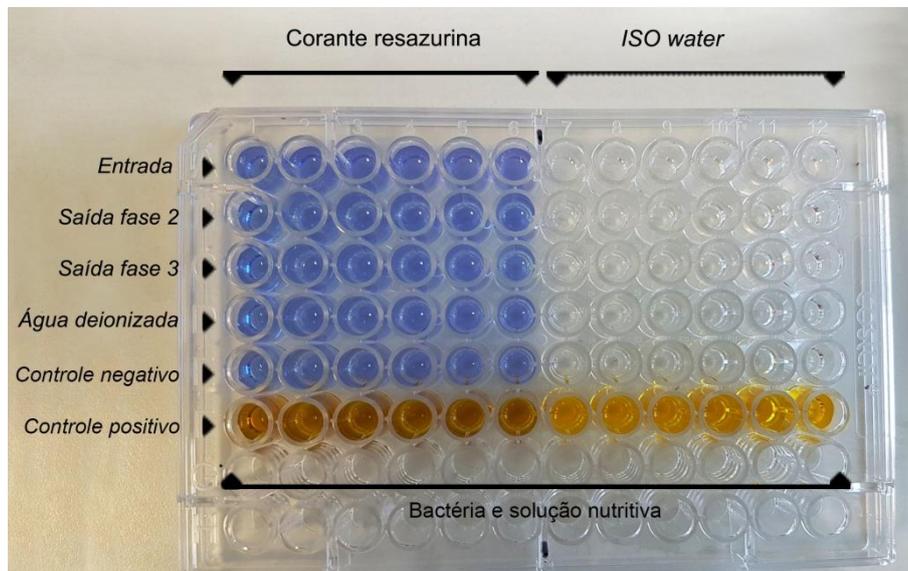


Fonte: Autora (2018).

Após o período de incubação, foram adicionados à metade das amostras nas microplacas 10 µL de solução nutritiva e 10 µL de *ISO water* apenas para avaliar o

crescimento das bactérias, e na outra metade, foram adicionados 10 µL de solução nutritiva e 10 µL do corante resazurina ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Figura 20). Em seguida, realizaram-se as leituras nos três comprimentos de onda no espectrofotômetro.

**Figura 20 - Microplaca com amostras, bactérias, solução nutritiva, corante resazurina e ISO water.**



Fonte: Autora (2018).

A solução nutritiva evita que qualquer inibição do crescimento dos microrganismos seja influenciada pela falta de nutrientes. O corante resazurina tem coloração azul e é redutível a resorufina, de cor rosa e elevada fluorescência (GONZÁLEZ-PINZÓN; HAGGERTY; MYROLD, 2012). Essa substância foi utilizada como indicador de oxirredução nos ensaios para medir a respiração aeróbica de células bacterianas. O processo de oxirredução de resazurina a resorufina é proporcional à taxa de respiração aeróbica (GONZÁLEZ-PINZÓN; HAGGERTY; MYROLD, 2012), possibilitando verificar a quantidade de células bacterianas inibidas na presença da amoxicilina ou de outro composto com potencial tóxico.

Após 18 e 42 horas da adição dos nutrientes, corante e *ISO water*, repetiram-se as leituras no espectrofotômetro a 405, 570 e 630 nm. A leitura feita no comprimento de onda de 405 nm nas microplacas sem o corante está relacionada com o crescimento das bactérias. Já os outros comprimentos de onda medem a fluorescência do corante: 570 nm associado à fluorescência da resorufina (rosa) e 630 nm, da resazurina (azul). Os resultados obtidos para cada amostra do MBR ao longo do período observado foi comparado com os controles a fim de observar a influência do meio no crescimento das bactérias.

#### 4.9.6 Influência da amoxicilina nas bactérias heterotróficas pelo método da respirometria

Para avaliar o efeito da amoxicilina nas bactérias heterotróficas presentes na biomassa do reator MBR, realizou-se o ensaio de respirometria em fase líquida, adotando o método de sistema aberto com aeração semicontínua. Foi utilizado como substrato uma solução de acetato de sódio ( $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ).

O experimento foi realizado utilizando um sensor de oxigênio dissolvido (marca Hach<sup>®</sup>, modelo HQ40d), agitador magnético (marca Solab<sup>®</sup>, modelo SL-90) para manter o lodo em suspensão, sistema de aeração com difusor de ar de pedra porosa (Dimensão 10,0 x 1,0 x 1,0 cm) e um béquer de vidro com 1 L de capacidade. A faixa de concentração de oxigênio dissolvido de trabalho foi de 1,0 a 3,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

Inicialmente, foram coletados 800 mL do lodo do sistema MBR e transferidos para o béquer de 1 L posicionado no agitador magnético e acoplado à sonda de OD. Posteriormente, iniciou-se o ciclo com e sem aeração: ligava-se a aeração até o OD atingir 3,0  $\text{mg L}^{-1}$ , desligava-se e esperava o OD alcançar a referência inferior (1,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) ou completar 4 minutos e, então, calculava-se a taxa de consumo de oxigênio (Equação 14).

$$TCO \text{ (mg /L. h)} = \frac{OD_{\text{máx}} - OD_{\text{min}}}{\Delta t} \quad \text{(Equação 14)}$$

Sendo:

- TCO: Taxa de consumo de oxigênio ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ );
- $OD_{\text{máx}}$ : Referência superior de oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ );
- $OD_{\text{min}}$ : Referência inferior de oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ );
- $\Delta t$ : Variação do tempo (h)

Quando o valor da TCO tornou-se constante, determinou-se a TCO endógena. Em seguida, foram adicionados 100 mL de substrato de acetato de sódio a uma concentração que não fosse limitante ao processo (no caso,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e aguardou-se o retorno do sistema à TCO endógena, que ocorreria quando todo substrato adicionado fosse consumido.

A fim de avaliar o efeito da presença da amoxicilina no metabolismo do grupo de bactérias de interesse, também foram adicionadas ao lodo, junto com o substrato, seis concentrações ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) do antibiótico amoxicilina e as respostas metabólicas foram comparadas com o sistema controle (ausência de amoxicilina).

A partir da TCO máxima, foi possível calcular o efeito dos compostos químicos que podem causar inibição na biomassa, conforme Equação 15 (BASNYAT, 2008).

$$Inibição = \frac{TCO_{controle} - TCO_{composto}}{TCO_{controle}} \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

Sendo:

- Inibição: Porcentagem de inibição causada pelo composto em estudo (%)
- $TCO_{controle}$ : TCO máxima do sistema controle ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ );
- $TCO_{composto}$ : TCO máxima do sistema contendo composto químico avaliado ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ );

#### 4.10 Análise dos resultados

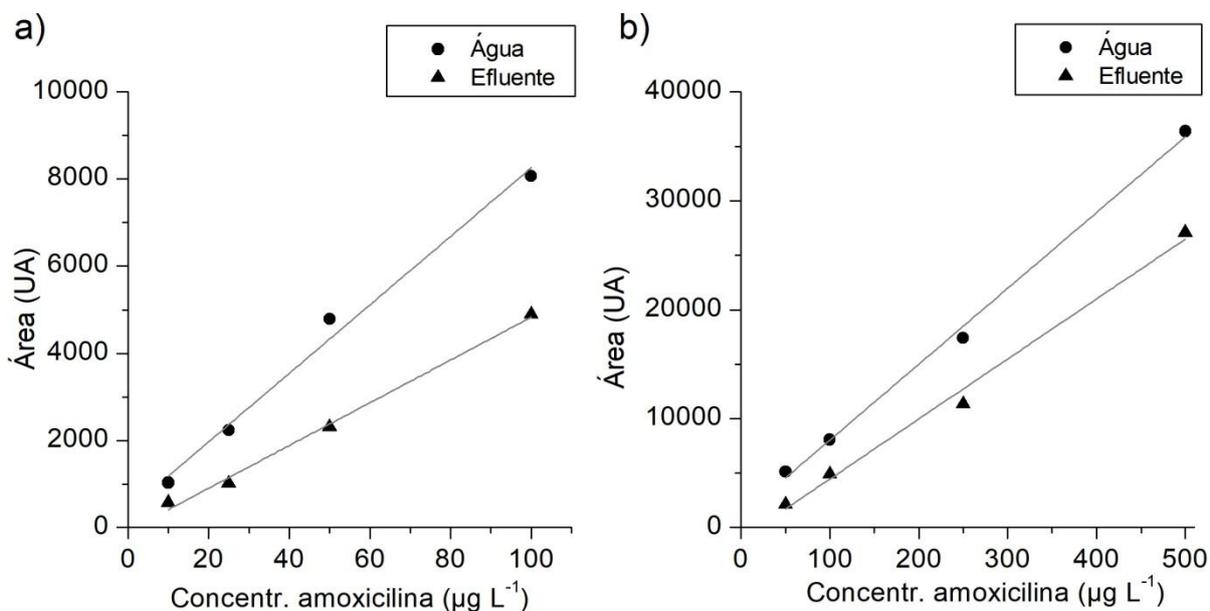
Os resultados foram compilados e submetidos à análise estatística base (média, desvio padrão, coeficiente de variação) e à análise de variância (ANOVA) utilizando o software Microsoft Excel<sup>®</sup>. Os gráficos foram elaborados no *software* Microcal Origin<sup>®</sup> 8.1 da OriginLab.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análises cromatográficas

A Figura 21 apresenta as curvas de calibração para análise da concentração de amoxicilina em LC-MS, em (A) tem-se a curva alta nas matrizes água ( $R^2=0,9903$ ) e efluente ( $R^2=0,9955$ ) e em (B), a curva baixa em água ( $R^2=0,9970$ ) e efluente ( $R^2=0,9928$ ).

Figura 21 – Curvas de calibração da amoxicilina: (A) Curva baixa; (B) Curva alta.



Fonte: Autora (2018).

O limite de detecção (LD) foi definido como a concentração mais baixa do analito (no caso, a amoxicilina) que pode ser distinguida com confiança razoável do branco operacional (uma solução de referência que não contém o analito). Os LDs foram estimados empiricamente ao analisar uma série de amostras contendo quantidades decrescentes do analito (BRITO, *et al.*, 2003). O cálculo do LD também pode ser feito pela Equação 16.

$$LD = \frac{3s}{S} \quad \text{(Equação 16)}$$

Onde:

s = desvio-padrão do branco;

S = coeficiente angular da curva de calibração;

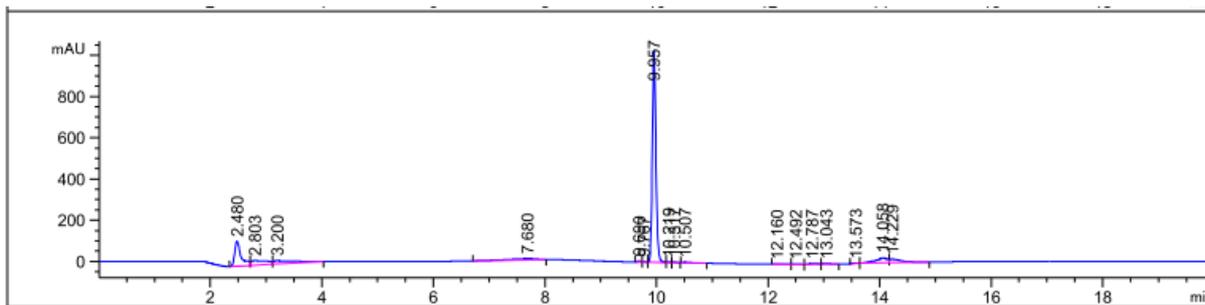
O limite de quantificação (LQ) foi obtido pela multiplicação entre o limite de detecção e o fator 3,33 (considerou-se um fator de 10 vezes o valor do desvio padrão das medidas do branco), para garantia de que neste ponto seja minimizada a interferência do erro instrumental na medida.

Os valores de limite de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 1,0 e 3,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a curva de calibração em fase aquosa e 1,8 e 6,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a curva em meio de efluente. Dadas as diferenças de sensibilidade da determinação de amoxicilina por LC-MS em decorrência da matriz da amostra, optou-se por trabalhar com a curva de calibração em meio de efluente para interpolação dos dados de modo a garantir uma maior confiabilidade dos resultados analíticos gerados.

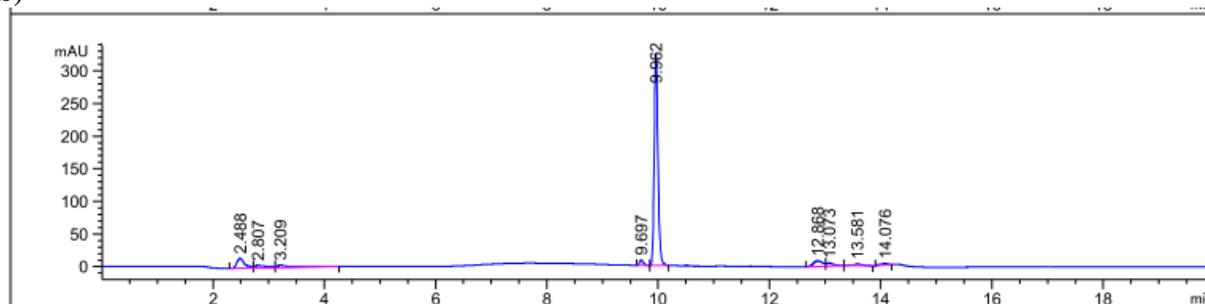
A Figura 22 mostra o cromatograma da análise da concentração de amoxicilina de uma amostra do afluente (entrada) e efluente (saída) da Fase 2. A Figura 23 apresenta o espectro de massas de uma amostra do afluente contendo amoxicilina.

Figura 22 – Cromatograma da amoxicilina. (A) Entrada - tempo de retenção: 9,957 min e área: 4578,87 UA; (B) Saída Fase 2 - tempo de retenção: 9,962 min e área: 1504,72 UA; UA = unidades arbitrárias.

a)

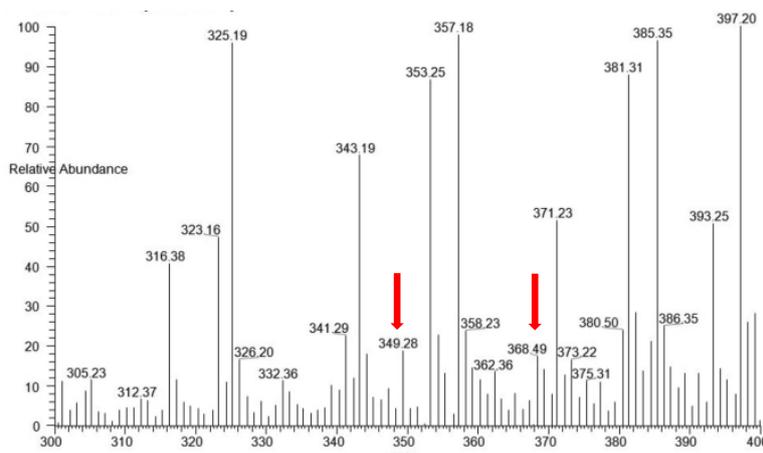


b)



Fonte: Autora (2018).

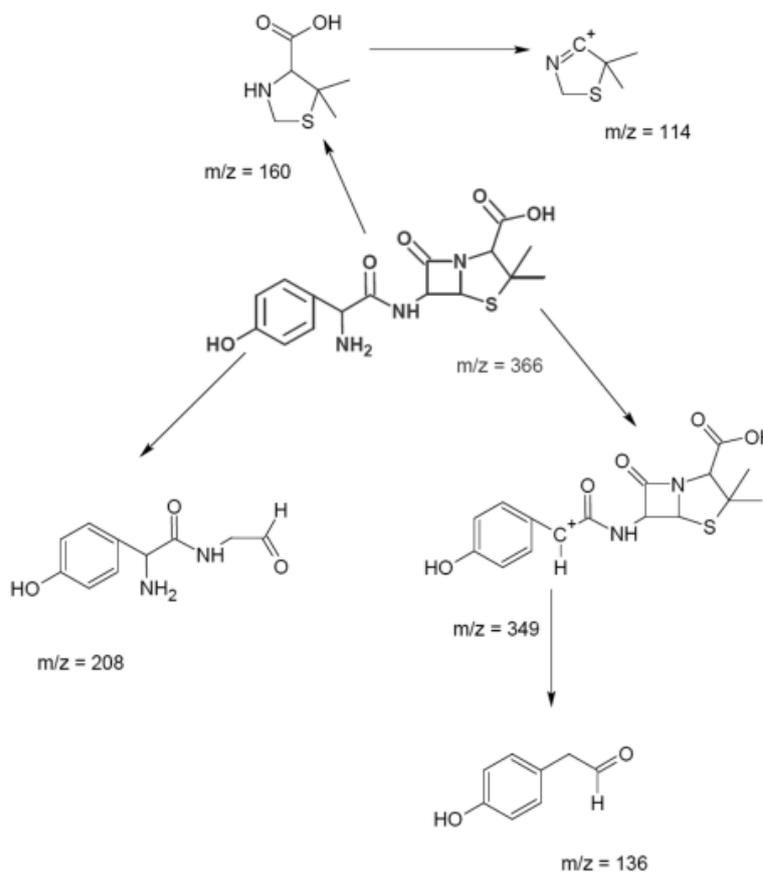
Figura 23 – Espectro de massas de uma amostra do afluente (entrada) contendo amoxicilina. As setas indicam os dois picos de razão massa/carga ( $m/z$ ) característicos desta substância:  $m/z = 366$  e  $m/z = 349$ .



Fonte: Autora (2018).

A análise dos espectros de massa de padrão de amoxicilina no modo de ionização positivo mostrou dois picos de razão massa/carga ( $m/z$ ) característicos desta substância:  $m/z = 366$  e um pico em  $m/z = 349$ , associado à fragmentação do composto com perda do grupamento  $-NH_3$ . A Figura 24 ilustra as principais rotas de fragmentação da molécula de amoxicilina em modo de ionização positivo e as razões  $m/z$  dos produtos (DESCHAMPS *et al.*, 2012).

**Figura 24 – Rotas de fragmentação da molécula de amoxicilina em modo de ionização positivo e possíveis produtos gerados, com sua relação massa/carga ( $m/z$ ).**



Fonte: DESCHAMPS *et al.* (2012)

## 5.2. Condição operacional do MBR

A Tabela 9 reúne os valores obtidos para os parâmetros de vazão da recirculação, do tempo de detenção hidráulica (TDH), pressão transmembrana (PTM), temperatura, fluxo e permeabilidade a 20 °C durante a operação do sistema.

Com o aumento da vazão do permeado da Fase 2 para a Fase 3, nota-se a redução do TDH de 40 para 20 horas conforme o esperado. A inclusão de mais uma membrana permitiu operar o sistema em fluxo contínuo (10 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>). A vazão e, conseqüentemente, o fluxo de operação tiveram uma baixa variabilidade ao longo dos 10 meses de operação, assegurando a robustez do sistema.

**Tabela 8 – Valores obtidos do tempo de detenção hidráulica (TDH), pressão transmembrana (PTM), temperatura, fluxo e permeabilidade a 20 °C nas três fases de operação. (n = 120 amostragens)**

Parâmetro	Fase	Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín
Vazão do permeado (L h <sup>-1</sup> )	1	1,00	0,04	4%	1,00	0,90
	2	1,00	0,02	2%	1,10	1,00
	3	2,00	0,04	2%	2,10	1,90
Vazão recirculação (L h <sup>-1</sup> )	1	3,18	0,18	5%	3,90	2,76
	2	3,26	0,13	4%	3,54	3,00
	3	6,63	0,12	2%	6,96	6,48
TDH* (h)	1	43,07	1,00	0,02%	45,31	42,65
	2	42,49	0,60	0,01%	42,65	40,28
	3	21,32	0,40	0,02%	23,39	20,71
PTM** (bar)	1	0,05	0,01	29%	0,07	0,03
	2	0,04	0,01	30%	0,04	0,04
	3	0,05	0,02	38%	0,13	0,03
Temperatura (°C)	1	21,75	1,94	9%	25,80	18,70
	2	19,01	2,19	11%	21,90	14,50
	3	20,56	1,92	9%	24,00	15,00
Fluxo a 20 °C (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	1	9,59	0,64	7%	10,53	8,07
	2	10,50	0,57	5%	11,68	9,73
	3	10,07	0,45	5%	11,20	9,06
Permeabilidade a 20 °C (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	1	217,10	59,39	27%	371,36	141,39
	2	262,52	54,03	21%	292,12	243,33
	3	233,48	49,71	21%	403,89	72,46

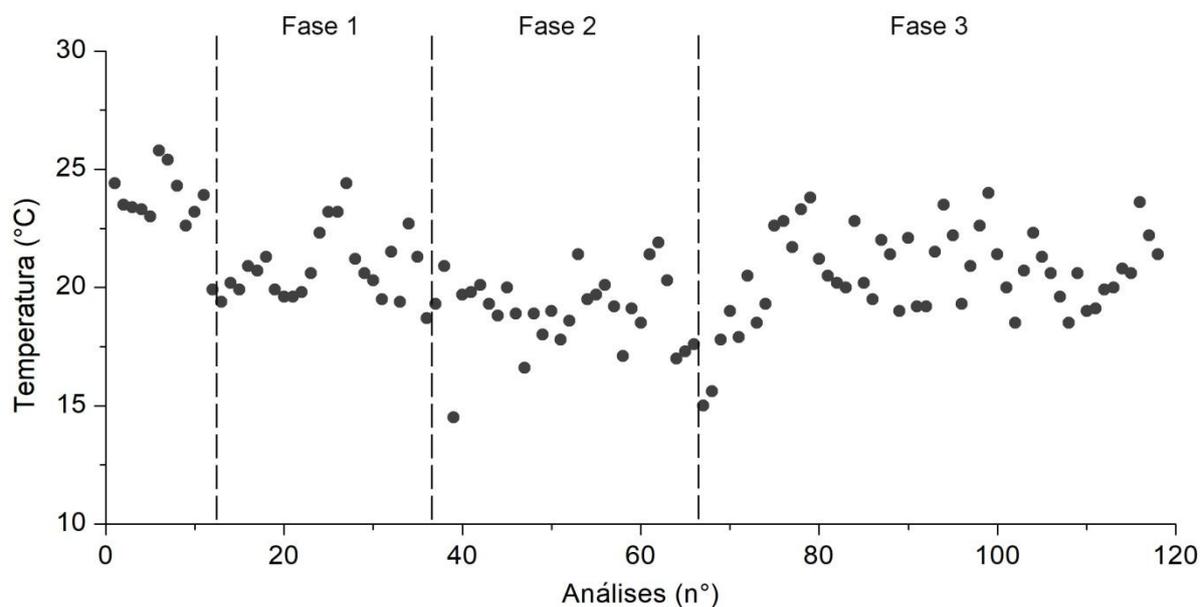
\*Tempo de detenção hidráulica; \*\*Pressão transmembrana

Fonte: Autora (2018).

A temperatura do licor misto de ambas as zonas do biorreator sofreu variação entre as fases devido às estações do ano (Figura 25). A temperatura máxima alcançada de 25,8 °C ocorreu durante a Fase 1, no verão, e a temperatura mínima registrada de 14,5 °C foi durante a Fase 2, no inverno. Hai *et al.* (2011) verificaram que o funcionamento de MBR é estável quando operados em uma faixa de 10 a 35 °C, já em temperaturas abaixo de 10° C há o comprometimento da redução de compostos hidrofílicos e a operação a 45° C mostrou reduções significativas na eficiência de remoção do carbono orgânico total, nitrogênio total e micropoluentes, além de queda na concentração de sólidos totais no lodo do reator. Cabe ressaltar, ainda, que variações da temperatura ambiente podem afetar o desempenho do sistema MBR em virtude da alteração da viscosidade do fluido, o que é particularmente crítico para ambientes com baixas temperaturas onde a viscosidade do fluido aumenta e, conseqüentemente, a permeabilidade da membrana (METCALF; EDDY, 2016). Nesse

cenário, não foi observado que a variação de temperatura entre as fases de operação do MBR tenha influenciado no funcionamento do sistema no presente projeto.

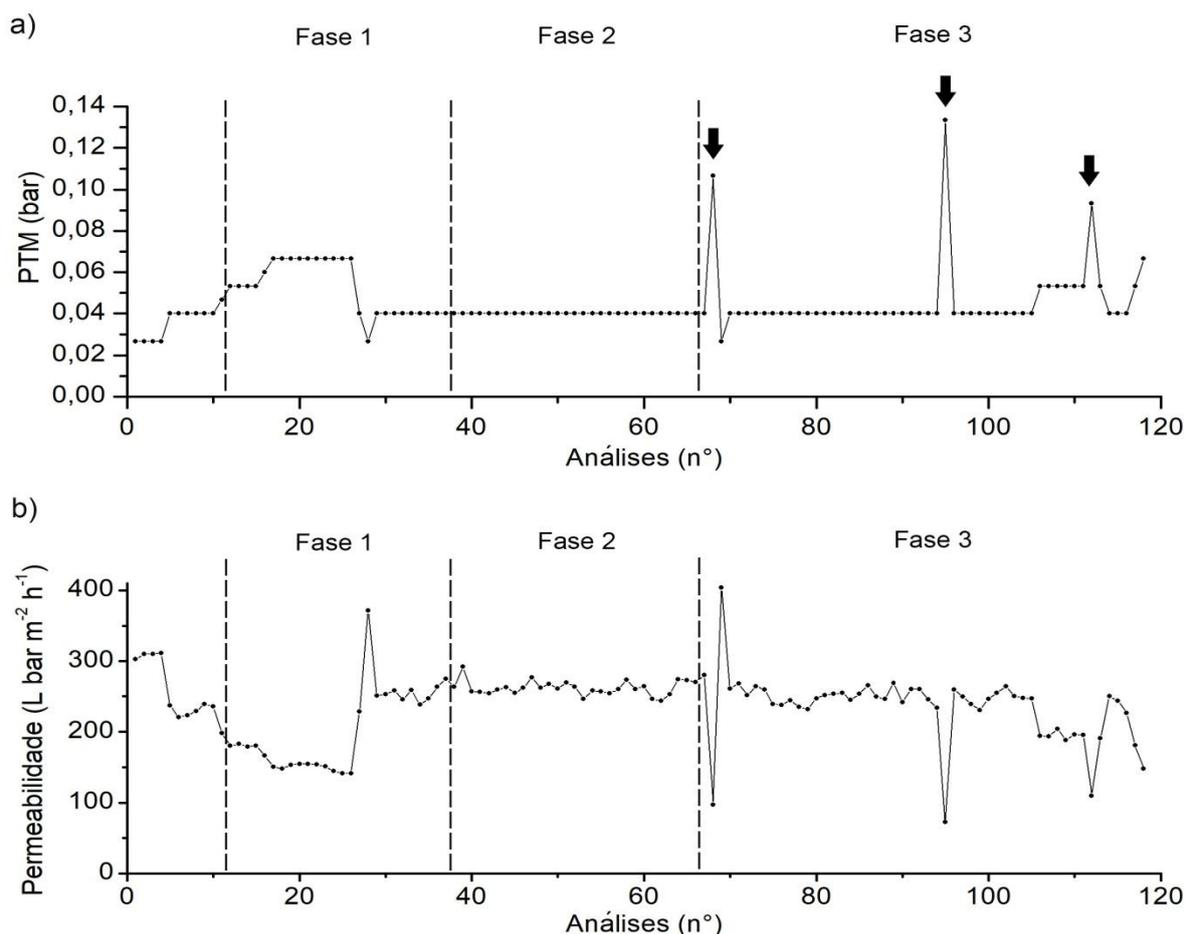
**Figura 25 – Variação temporal da temperatura no licor misto nas três fases de operação (n = 120 amostragens).**



Fonte: Autora (2018).

Em dados momentos da operação do sistema, a PTM atingiu valores acima de 0,1 bar, indicando a necessidade da limpeza química da superfície da membrana. Esse evento repetiu-se três vezes apenas durante a terceira fase de operação; nas fases anteriores não houve a necessidade de limpeza (Figura 26). Isso é justificado pelo aumento da vazão de trabalho e alteração do tempo de detenção hidráulica, pois o TDH afeta diretamente o *fouling* e o desempenho da membrana em um sistema MBR, aumentando a concentração de sólidos e a velocidade que o material chega à superfície da membrana (YU *et al.*, 2015).

**Figura 26 – Variação temporal da (A) pressão transmembrana (PTM) e (B) permeabilidade a 20 °C nas três fases de operação. As setas indicam os momentos das limpezas na membrana (n = 120 análises).**



Fonte: Autora (2018).

A Tabela 10 apresenta os valores de sólidos em suspensão e a relação alimento/microrganismo (A/M) no licor misto do MBR.

**Tabela 9 – Valores obtidos da concentração de sólidos suspensos totais e voláteis e a relação alimento/microrganismo nas três fases de operação (n = 120 amostragens).**

Parâmetro	Fase	Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín
SST (mg L <sup>-1</sup> )	1	2548,55	514,45	20 %	3584,96	1694,90
	2	2322,76	517,92	22 %	3974,05	1674,96
	3	6191,55	1197,94	19 %	10975,98	4181,78
SSV (mg L <sup>-1</sup> )	1	2164,67	397,31	18 %	2969,16	1529,18
	2	2031,02	405,76	20 %	3393,86	1428,13
	3	5067,33	976,17	19 %	8883,19	3542,58
Relação A/M* (kg <sub>DQO</sub> kg <sub>SSV</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	1	0,23	0,15	63 %	0,82	0,05
	2	0,33	0,20	61 %	0,80	0,12
	3	0,18	0,09	50 %	0,42	0,03

\*Relação Alimento/Microrganismo

Fonte: Autora (2018).

A relação A/M (alimento/microrganismo) ou carga de lodo baseia-se no conceito de que a quantidade de alimento ou substrato disponível por unidade de massa dos microrganismos é relacionada com a eficiência do sistema. Assim, pode-se entender que quanto maior a carga orgânica fornecida a um valor unitário de biomassa (elevada relação A/M), menor será a eficiência na assimilação deste substrato, mas, por outro lado, menor será o volume requerido para o reator. Inversamente, quanto menos matéria orgânica for fornecida às bactérias (baixa relação A/M) maior será a avidéz pelo alimento, implicando em maior eficiência na redução da carga orgânica, conjuntamente com o requisito de maior volume para o reator. (VON SPERLING, 1997). O objetivo do seu controle é o de manter constante esta relação, de forma a garantir remoção uniforme de substrato. Os valores de A/M aplicados em MBR são, geralmente, abaixo de  $0,2 \text{ kg}_{\text{DQO}} \text{ kg}_{\text{SST}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (JUDD, 2011). Devido à baixa relação A/M e ao baixo rendimento de lodo resultante, o reator operou sem formar excesso de lodo. Ou seja, durante todo o período monitorado, o MBR operou com idade do lodo “infinita”, pois não houve a necessidade de fazer o descarte do lodo.

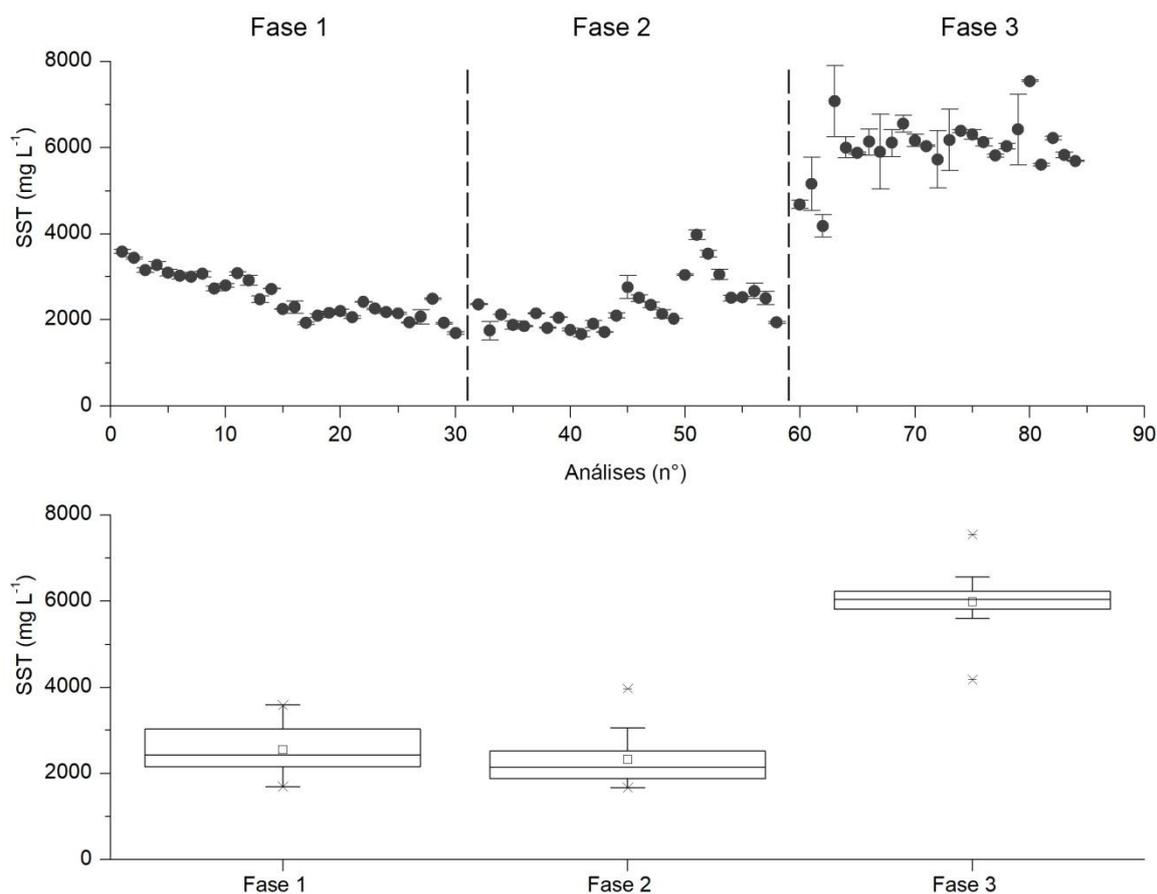
Os valores médios de sólidos suspensos totais (SST) foram  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  e  $6,1 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente para as Fases 1, 2 e 3. A relação SSV/SST para as Fases 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 0,85, 0,87 e 0,82 e a relação alimento/microrganismo (A/M) foram de 0,16  $\text{kg}_{\text{DQO}} \text{ kg}_{\text{SST}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na Fase 1, de 0,22  $\text{kg}_{\text{DQO}} \text{ kg}_{\text{SST}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na Fase 2 e de 0,43  $\text{kg}_{\text{DQO}} \text{ kg}_{\text{SST}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na Fase 3.

O MBR operou com a concentração de SST abaixo do valor típico para MBR que, conforme Stephenson *et al.* (2000), pode variar numa faixa de 5 a  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Wang, Huang e Yuan (2005) operaram um sistema MBR anóxico/aeróbio e observaram um crescimento dos sólidos suspensos (de 8 para  $17 \text{ g L}^{-1}$ ) quando TDH = 15 h e relação SSV/SST = 0,74. Chen *et al.* (2003) realizaram o tratamento de águas residuárias de indústria eletrônica por MBR e obteve SST =  $8 \text{ g L}^{-1}$  em TDH = 40 h. Jo *et al.* (2016) operaram um MBR a vazão de  $15 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ , TDH = 44 h e obteve uma concentração de sólidos suspensos totais de  $5 \text{ g L}^{-1}$ .

A Figura 27 apresenta a concentração de sólidos suspensos totais no MBR durante o período observado. Nota-se que o valor da concentração de SST na Fase 3 é duas vezes maior que a concentração das fases anteriores. Lembrando que a vazão de trabalho foi duplicada na operação desta fase, tal resultado indica a relação proporcional da concentração de sólidos totais da biomassa com a carga orgânica aplicada no biorreator.

A análise estatística mostrou que não há variância significativa entre os dados das Fases 1 e 2 ( $p > 0,05$ ), indicando que a incorporação de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina na composição esgoto sintético não interferiu na concentração dos sólidos suspensos do MBR.

**Figura 27 – Variação temporal de sólidos suspensos totais (SST) no biorreator durante as três fases monitoradas e análise estatística dos resultados (n = 90 amostragens).**



Fonte: Autora (2018).

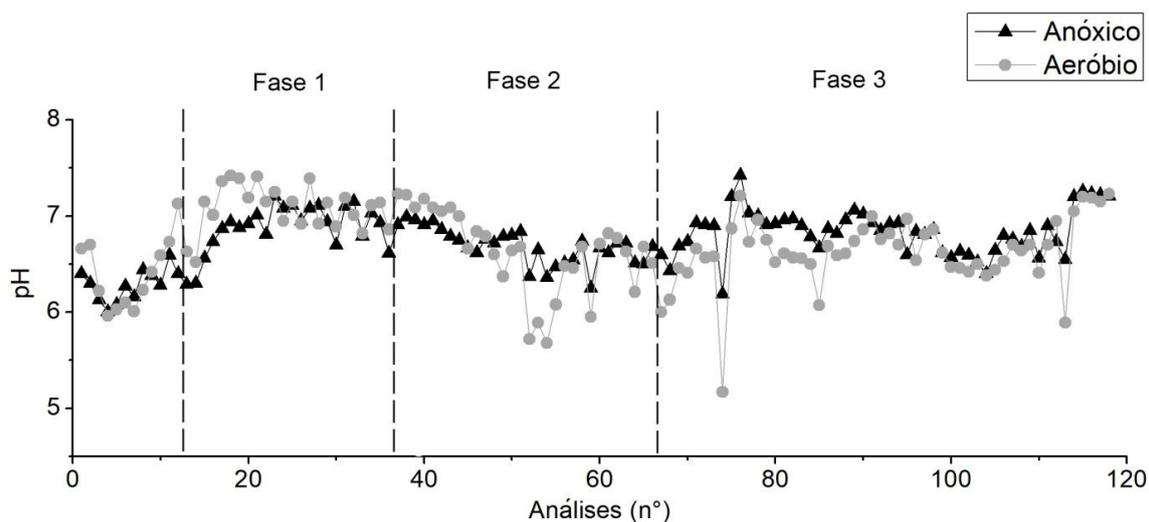
Na Tabela 11 encontram-se os valores obtidos de pH do licor misto das zonas anóxica e aeróbia e a Figura 28 apresenta a variação temporal de pH durante todo o período monitorado. De acordo com Besha *et al.* (2017), o MBR operou dentro da faixa de pH considerada ótima recomendada (pH = 6 a 7) para o desempenho biológico de remoção de carbono orgânico total e nitrogênio total.

**Tabela 10 – Valores de pH nas zonas anóxica e aeróbia do biorreator nas três fases de operação (n = 120 amostragens).**

Parâmetro	Fase	Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín
pH – zona anóxica	1	6,7	0,4	5%	7,2	6,0
	2	6,7	0,3	5%	7,0	6,3
	3	6,8	0,2	4%	7,4	6,2
pH – zona aeróbia	1	6,9	0,4	6%	7,4	6,0
	2	6,6	0,4	6%	7,2	5,7
	3	6,6	0,4	5%	7,2	5,2

Fonte: Autora (2018).

Figura 28 – Variação temporal do pH nas zonas anóxica e aeróbica do biorreator durante as três fases de operação (n = 120 amostragens).



Fonte: Autora (2018).

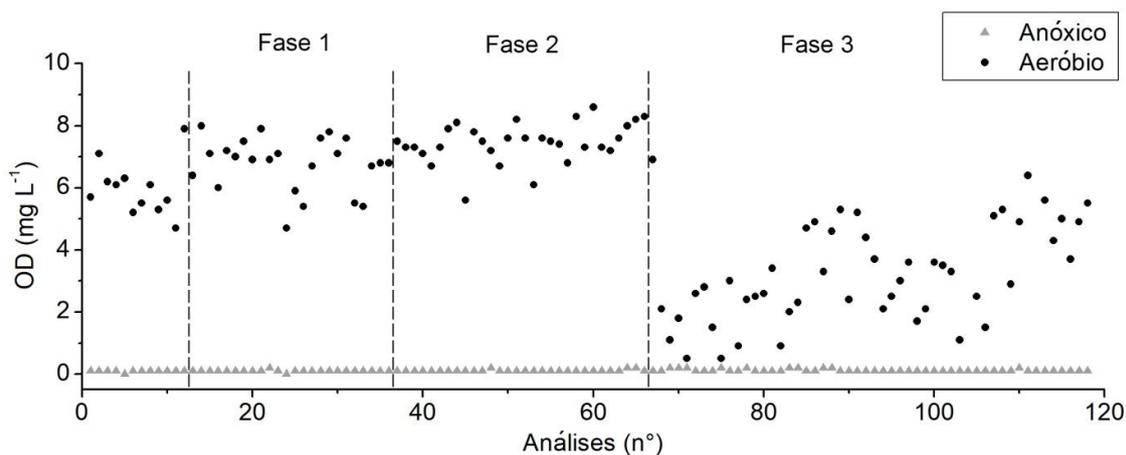
Na Tabela 12 constam os valores de OD do lodo das câmaras anóxica e aeróbia do MBR e a Figura 29 corresponde à variação temporal durante todo o período.

Tabela 11 – Valores de oxigênio dissolvido (OD) nas zonas anóxica e aeróbica do biorreator nas três fases de operação (n = 120 amostragens).

Parâmetro	Fase	Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín
OD (mg L <sup>-1</sup> ) zona anóxica	1	0,10	0,03	30%	0,20	0,00
	2	0,11	0,03	26%	0,20	0,10
	3	0,12	0,04	33%	0,20	0,10
OD (mg L <sup>-1</sup> ) zona aeróbia	1	6,38	1,17	18%	8,00	3,30
	2	7,45	1,19	16%	8,60	5,60
	3	3,13	1,68	54%	6,90	0,10

Fonte: Autora (2018).

Figura 29 – Variação temporal do oxigênio dissolvido (OD) nas zonas anóxica e aeróbica do biorreator nas três fases de operação.



Fonte: Autora (2018).

O OD da zona anóxica não apresentou grandes variações, mantendo-se próximo à zero ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante todo o período monitorado, favorecendo a desnitrificação do sistema (ZOPPAS; BERNARDES; MENEGUZZ, 2016).

Uma vazão de ar de  $4 \text{ mL min}^{-1}$  manteve o OD da câmara aeróbia numa faixa de 6,4 a  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  durante as Fases 1 e 2. Entretanto, com o aumento da vazão de operação do sistema e o conseqüente aumento da carga orgânica aplicada, da relação A/M e da concentração de SST, os valores de OD na Fase 3 reduziram e tiveram grandes variações. É possível que a elevação dos valores desses parâmetros tenha intensificado a taxa de consumo de oxigênio e prejudicado a manutenção do OD no meio, uma vez que o consumo de oxigênio por parte dos microrganismos está associado ao crescimento da biomassa e à remoção de substrato (MACFARLANE, 2017). A velocidade do consumo de oxigênio é proporcional à facilidade de degradação desses substratos ou associada à sua disponibilidade no meio (ANDREOTTOLA *et al*, 2005). Entretanto, pode se verificar que essa variabilidade no suprimento de OD na zona aeróbia não chegou a afetar de maneira significativa o crescimento da biomassa na Fase 3, uma vez que a concentração de SST no sistema apresentou pouca variabilidade, conforme apresentado na Figura 23. Além disso, o fornecimento de oxigênio dissolvido na zona aeróbia era necessário para oxidar apenas o  $\text{N-NH}_4^+$ , uma vez que a matéria orgânica já havia sido consumida na zona anóxica. Dessa forma, acredita-se que a intermitência no nível de OD no sistema não tenha interferido diretamente nos mecanismos de remoção de amoxicilina do afluente na Fase 3 de operação do MBR.

### **5.3. Monitoramento de parâmetros de controle e de qualidade do afluente e efluente**

Algumas variáveis físico-químicas foram monitoradas no afluente e no efluente para avaliar o desempenho e controlar o sistema MBR, a saber: pH, alcalinidade, condutividade elétrica, turbidez e cor. Parâmetros de qualidade do efluente tratado também foram avaliados, como matéria orgânica, série nitrogenada, fósforo total e amoxicilina.

#### **5.3.1. Avaliação do pH e remoção da cor, turbidez, alcalinidade e condutividade elétrica**

Os resultados das análises de pH, alcalinidade, cor, turbidez e condutividade elétrica, do afluente do sistema (entrada) e efluente (saída) estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 12 – Valor de pH e concentração de alcalinidade, cor, turbidez e condutividade elétrica do afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases de operação do MBR (n = 90 amostragens).

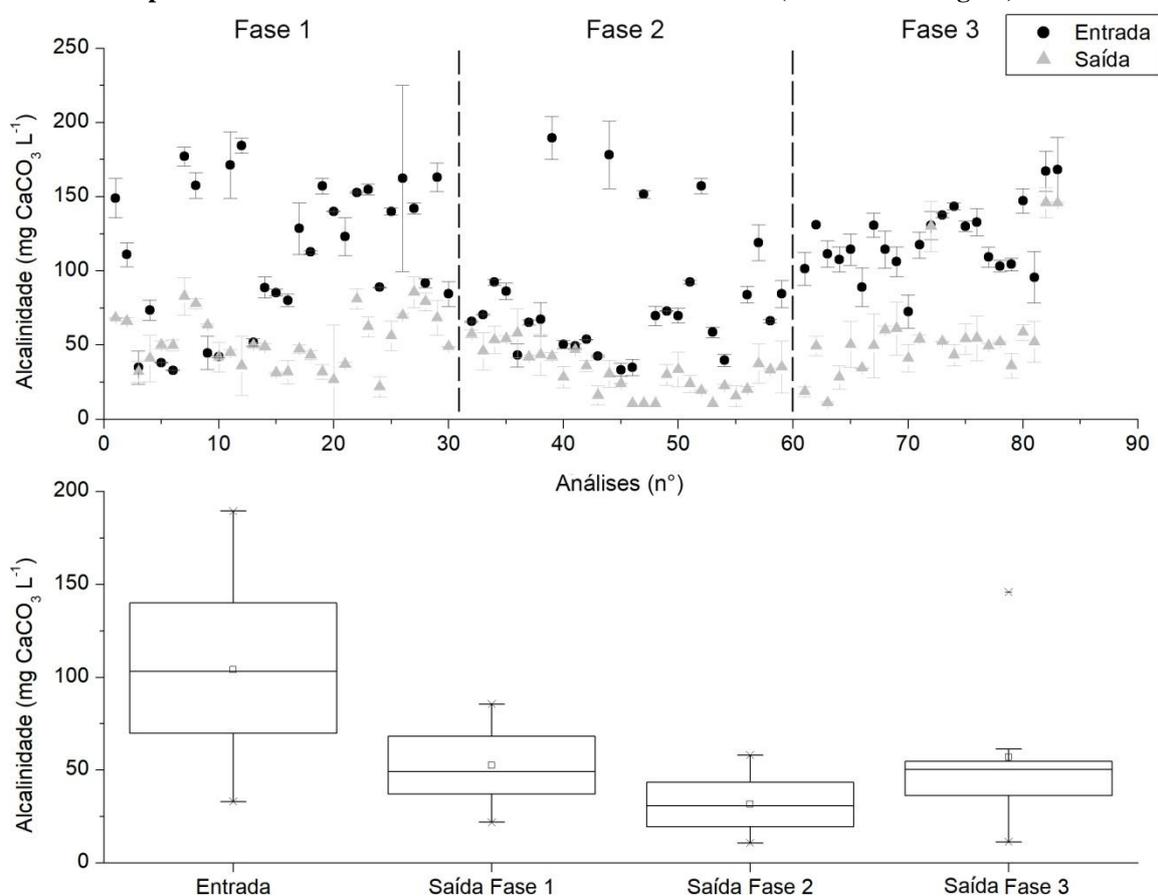
Parâmetro	Fase	Entrada					Saída					
		Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín	Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín	Remoção
pH	1	6,4	0,7	10%	7,98	5,35	6,0	0,5	9%	7,61	5,37	-
	2	6,1	0,5	8%	7,25	5,40	6,0	0,3	5%	6,56	5,46	-
	3	6,4	0,3	4%	7,09	5,99	6,0	0,3	5%	6,77	5,45	-
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	1	112,2	47,7	42%	184,2	33,0	52,6	18,3	34%	85,6	21,9	53,1%
	2	81,1	42,6	52%	189,5	33,4	32,0	14,9	46%	58,1	10,7	59,6%
	3	214,9	249,0	113%	984,5	65,4	151,2	204,0	130%	744,6	11,2	29,8%
Cor (uC)	1	95,2	33,8	35%	146,0	17,1	3,0	0,8	27%	4,8	1,8	-
	2	79,9	21,6	27%	106,0	9,1	2,6	1,1	44%	5,3	0,8	-
	3	113,2	28,1	25%	172,0	71,5	11,0	5,4	49%	17,0	0,4	-
Turbidez (UNT)	1	59,2	28,9	48%	145,0	21,3	0,9	0,4	40%	1,7	0,4	98,5%
	2	59,4	40,6	68%	159,5	14,6	0,7	0,5	63%	1,6	0,1	98,8%
	3	43,4	30,1	69%	136,0	10,3	0,2	0,1	68%	0,7	0,1	99,5%
Condutividade elétrica (µS cm <sup>-1</sup> )	1	1162,2	161,4	14%	1395,5	820,5	1010,8	106,1	10%	1155,0	734,5	13,0%
	2	1143,8	82,8	7%	1359,5	739,9	973,5	43,6	4%	1073,0	878,0	14,9%
	3	1437,8	114,6	8%	1703,5	1083,4	1199,8	83,8	7%	1448,5	1044,5	16,6%

Fonte: Autora (2018).

A amostragem do afluente ao MBR era realizada coletando um volume do esgoto sintético bruto da parte inferior do tanque de alimentação através de uma torneira acoplada. Durante a operação do sistema, notou-se um problema relacionado à sedimentação de alguns reagentes que formavam aglomerados no fundo do tanque. Possivelmente, pequenas partes desse aglomerado permaneciam nas amostras coletadas, aumentando a variabilidade de composição química no afluente do sistema MBR.

Observa-se que, embora o pH não tenha sofrido variação entre a entrada e saída, houve remoção da alcalinidade (em aproximadamente 56%). A variação temporal da alcalinidade nas amostras da entrada e saída está apresentada na Figura 30. Conforme mostra Ahn (2006), a variação de alcalinidade está relacionada com o processo de remoção de nitrogênio. Assim, uma porcentagem de remoção deste parâmetro indica que houve remoção de nitrogênio pelos processos de nitrificação e desnitrificação, conforme será discutido posteriormente.

**Figura 30 - Variação temporal da alcalinidade no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 85 amostragens).**



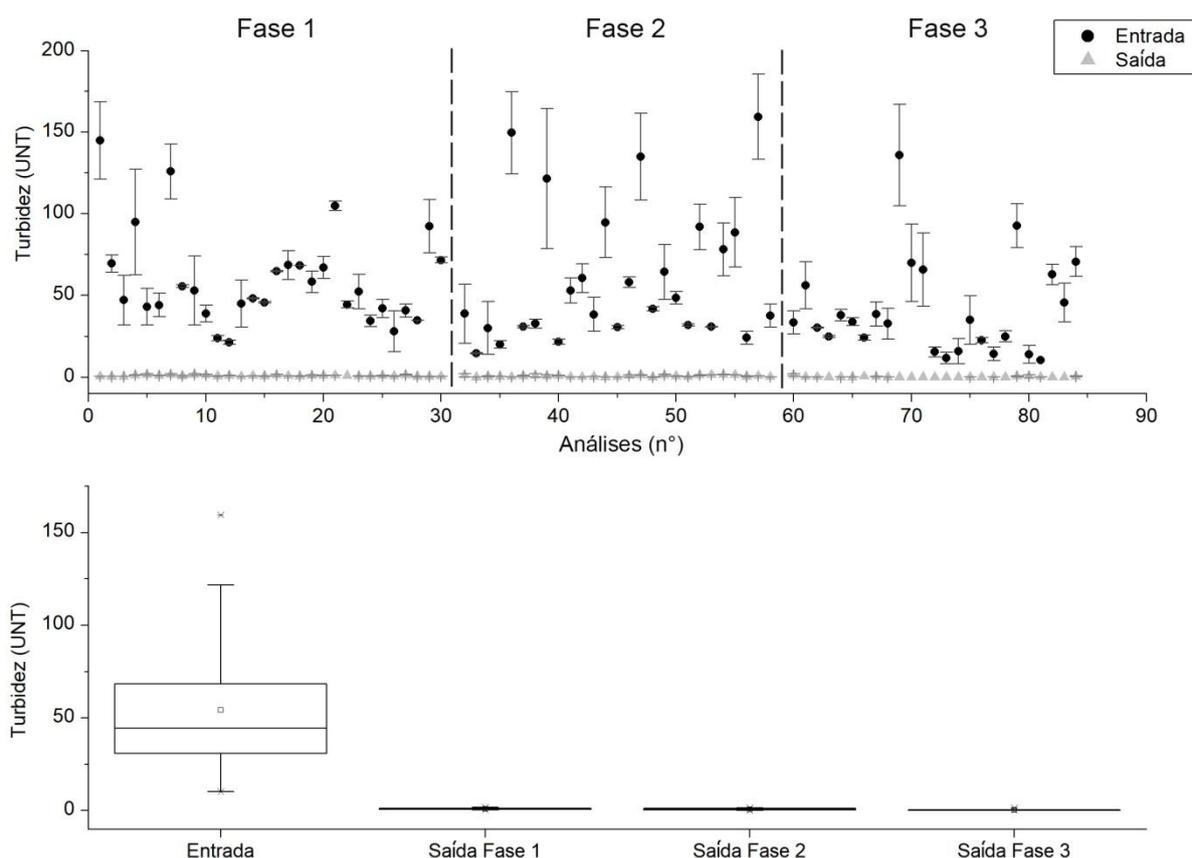
Fonte: Autora (2018).

De acordo com a Tabela 13, houve elevada remoção de cor (em média de 93%). Entretanto, é preciso lembrar que o parâmetro de cor pode ser identificado como “cor

verdadeira”, cuja amostra tenha passado por filtros de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , e “cor aparente”, quando se faz a leitura da amostra bruta (sem filtrar) (método 2120-B, APHA, 2016). As amostras coletadas no presente projeto não foram filtradas para a análise de cor, entretanto, por configuração do biorreator, as amostras de saída passaram por membranas ultrafiltrantes (porosidade 0,1  $\mu\text{m}$ ). Assim, os valores médios de cor apresentados na Tabela 13 correspondem à “cor aparente” na entrada e “cor verdadeira” na saída e, portanto, não é possível avaliar a porcentagem efetiva de remoção de cor.

A variação temporal da turbidez é apresentada na Figura 31.

**Figura 31 - Variação temporal da turbidez no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 85 amostragens).**



Fonte: Autora (2018).

Os valores de turbidez de efluente de MBR são, geralmente, abaixo de 1,0 UNT (MELIN *et al.*, 2006). Os valores médios obtidos nas três fases foram 0,9, 0,7 e 0,2 UNT para as Fases 1, 2 e 3 respectivamente. A turbidez do efluente MBR está relacionada com a integridade do módulo de membrana, tal que valores altos no permeado podem indicar que há vazamento de partículas no processo de filtração (ZHANG *et al.*, 2015). Deste modo, é possível afirmar que as membranas permaneceram íntegras durante todo o período operado.

O rompimento de membranas levaria a uma elevada turbidez no permeado ( $>1,0$  UNT) de MBR e é considerado um problema, principalmente, quando se objetiva a remoção de microrganismos do efluente tratado. Zhang *et al.* (2015) observaram que o efluente MBR de seu estudo apresentou turbidez na faixa de 0,23-1,90 UNT e média de 6,07 cistos  $L^{-1}$  de *Giardia*, indicando um elevado risco anual de infecção ( $9,83 \times 10^{-3}$ ) comparado ao risco anual aceitável de infecção ( $1,00 \times 10^{-4}$ ) de exposição à água tratada.

Vercellino *et al.* (2015) mostraram que estações de tratamento convencionais não promovem a redução da condutividade elétrica do efluente antes do seu lançamento aos corpos receptores, devido à permanência de grandes quantidades de íons ligados à matéria orgânica decomposta durante o processo de tratamento. A baixa redução da condutividade elétrica (cerca de 15%) pode indicar a presença de sólidos dissolvidos com carga na saída do sistema, sugerindo que os mecanismos de remoção/degradação atuantes no sistema de MBR também não tem eficiência na remoção desses compostos iônicos solúveis.

### 5.3.2. Remoção de matéria orgânica

A Tabela 14 mostra a concentração de matéria orgânica na entrada e saída do sistema MBR nas três fases monitoradas.

**Tabela 13 – Concentração de DQO e COD do afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases de operação do MBR (n = 90 amostragens).**

Parâmetro	Fase	Entrada					Saída					Remoção
		Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín	Média	D.P.	C.V.	Máx	Mín	
DQO ( $mg L^{-1}$ )	1	<b>747,9</b>	398,1	53%	2472,5	191,2	<b>42,8</b>	25,7	60%	97,4	3,8	<b>94,3 %</b>
	2	<b>1064,8</b>	595,2	56%	2692,5	412,5	<b>34,6</b>	26,0	75%	99,8	5,6	<b>96,8 %</b>
	3	<b>836,3</b>	391,4	47%	1673,2	235,2	<b>47,4</b>	23,7	50%	90,1	2,0	<b>94,3 %</b>
COD ( $mg L^{-1}$ )	1	<b>67,4</b>	43,3	64%	143,2	14,2	<b>7,8</b>	3,0	38%	14,1	0,1	<b>88,4 %</b>
	2	<b>34,6</b>	13,2	38%	69,1	14,9	<b>5,5</b>	2,0	37%	11,2	1,5	<b>84,1 %</b>
	3	<b>76,6</b>	38,5	50%	166,8	32,0	<b>26,0</b>	16,6	63%	79,5	6,7	<b>66,1 %</b>

Fonte: Autora (2018).

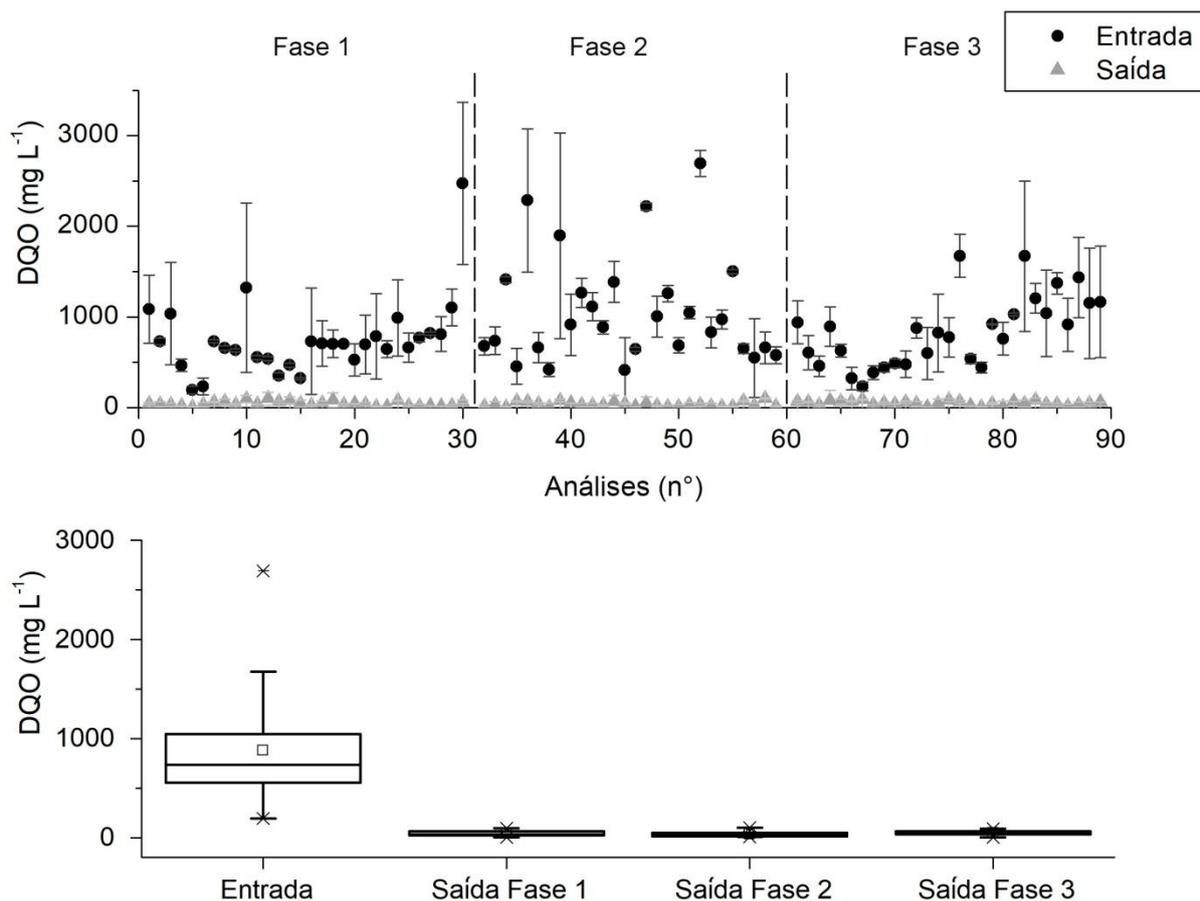
As eficiências médias de remoção de carbono orgânico dissolvido nas Fases 1 e 2 foram de 88,4 e 84,1% e a análise estatística indicou que não há diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Isso pode indicar que a inserção do antibiótico amoxicilina não interferiu da remoção de COD.

Já a Fase 3 apresentou uma concentração de COD substancialmente maior no permeado com o aumento da vazão de operação que nas fases anteriores. Devido isso, a porcentagem de remoção reduziu para 66,1%.

As porcentagens de remoção de DQO foram 94,3, 96,8 e 94,3% nas Fases 1, 2 e 3 respectivamente. A análise estatística mostrou que não há variação significativa entre as porcentagens de DQO removido das três fases ( $p > 0,05$ ), indicando que a presença da amoxicilina também não influenciou na eficiência desse parâmetro. Xia *et al.* (2012) também avaliaram a remoção de antibióticos pelo processo MBR em diferentes TRS (60, 30, 10 e 3 dias) e obteve porcentagens de remoção de DQO sempre acima de 96%. Nguyen *et al.* (2017) obtiveram eficiências de remoção de DQO sempre acima de 96% tratando esgoto hospitalar. Wang *et al.* (2016) observaram que a porcentagem de remoção de DQO permaneceu acima de 91% com a adição de cinco fármacos ao esgoto sintético. Xiao *et al.* (2017) verificaram que os antibióticos trimetoprim e sulfametoxazol não tiveram um impacto significativo na remoção de DQO (93,9%). Os resultados desses estudos demonstram que a capacidade de remoção de material orgânico não foi impactada com a presença de antibióticos ou outros fármacos.

A não variação estatística entre as porcentagens de remoção de DQO das três fases corrobora com o estudo de Win *et al.* (2016), em que a eficiência de remoção de DQO não foi afetada ao mudar o TDH de 8 para 4 h no sistema MBR. Considerando todo o período monitorado, nota-se que a elevada remoção média de matéria orgânica (aproximadamente 95% para DQO e 80% para COD) era esperada para o sistema de MBR, pois a remoção elevada de DQO é característica do processo especialmente em grandes tempos de detenção hidráulica (TDH) como os do presente estudo, de aproximadamente 40 e 20 horas. Sistemas MBR com TDH acima de 3 h já apresentam elevada remoção de matéria orgânica (JUDD, 2011). Bezerra e Matsumoto (2011) também operaram o MBR com o TDH de 40 h (1,7 dias) e obtiveram remoção de DQO acima de 93%. Bai *et al.* (2012) obtiveram 92,6% de remoção ao operarem o MBR com TDH de 25 h.

**Figura 32 – Demanda química de oxigênio (DQO) no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 90 amostragens).**



Fonte: Autora (2018).

A grande variabilidade de concentração de DQO no afluente se deve a dois fatores principais: (1) O biofilme formado na parede interna do tanque de alimentação consumia a matéria orgânica do esgoto sintético bruto e reduzia a média geral da concentração de DQO. (2) Alguns reagentes que compõem o esgoto sintético (em especial, a celulose) não eram totalmente solúveis em água e sedimentava no fundo do tanque formando aglomerados do composto. Como a amostragem do esgoto bruto (entrada) era realizada na porção inferior do tanque de alimentação, as amostras coletadas para análise possivelmente ainda continham aglomerados de celulose, elevando, assim, a média geral de DQO.

### 5.3.3. Remoção de nitrogênio

Na Tabela 15 estão apresentadas as concentrações de nitrogênio total e de suas frações como nitrogênio amoniacal e orgânico no afluente (entrada) e permeado (saída) e nitrogênio como nitrito e nitrato no permeado (saída) e as respectivas porcentagens de remoção.

**Tabela 14 – Concentração das frações de nitrogênio no afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases de operação do MBR (n = 80 amostragens).**

	Entrada						Saída					Remoção
	Fase	Média	D.P.	C.V.	Máx	Min	Média	D.P.	C.V.	Máx	Min	
N-total (mg L <sup>-1</sup> )	1	<b>39,2</b>	8,6	21%	56,4	25,9	<b>10,8</b>	3,1	28%	18,6	7,0	<b>72,5%</b>
	2	<b>40,2</b>	7,9	20%	56,3	27,0	<b>8,3</b>	2,6	30%	19,8	4,8	<b>79,4%</b>
	3	<b>43,8</b>	4,3	11%	55,0	33,8	<b>9,8</b>	5,5	56%	27,7	3,2	<b>77,6%</b>
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1	<b>24,3</b>	5,2	22%	34,9	16,8	<b>0,3</b>	0,5	155%	2,0	n.d.	<b>98,8%</b>
	2	<b>30,6</b>	5,2	17%	42,6	21,1	<b>0,4</b>	0,4	98%	1,9	n.d.	<b>98,7%</b>
	3	<b>34,3</b>	6,1	15%	47,4	24,5	<b>0,02</b>	0,1	509%	0,4	n.d.	<b>99,9%</b>
N-Org (mg L <sup>-1</sup> )	1	<b>14,9</b>	6,8	45%	29,2	3,5	<b>4,0</b>	1,6	40%	8,5	0,8	<b>73,2%</b>
	2	<b>9,6</b>	7,1	74%	25,0	1,5	<b>2,9</b>	1,5	51%	5,5	n.d.	<b>69,8%</b>
	3	<b>9,4</b>	3,9	40%	20,5	3,3	<b>6,6</b>	5,6	70%	26,9	n.d.	<b>29,8%</b>
N-NO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	1	-	-	-	-	-	<b>6,3</b>	2,5	39%	14,5	3,6	-
	2	-	-	-	-	-	<b>4,5</b>	1,4	30%	8,2	1,4	-
	3	-	-	-	-	-	<b>4,5</b>	2,0	45%	8,7	0,2	-
N-NO <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	1	-	-	-	-	-	<b>n.d</b>	n.d.	0%	n.d.	n.d.	-
	2	-	-	-	-	-	<b>0,2</b>	0,2	162%	1,0	n.d.	-
	3	-	-	-	-	-	<b>0,1</b>	0,3	376%	1,3	n.d.	-

\*n.d. = não detectável, abaixo do limite de quantificação.

Fonte: Autora (2018).

De modo geral, é possível dizer que ocorreu remoção do nitrogênio total em 72,5%, 79,4% e 77,6%, e de nitrogênio amoniacal em 98,8%, 98,7% e 99,9% nas Fases 1, 2 e 3, respectivamente. Wang, Huang e Yuan (2005) ao avaliarem a remoção de nitrogênio em um MBR com configuração anóxica-aeróbia, obtiveram 72% de remoção de nitrogênio total e 97% de remoção de nitrogênio amoniacal, mesmo operando o sistema com o tempo de detenção hidráulica (TDH) de 15 horas. Ao aplicar o teste ANOVA constatou-se que não há diferença estatística significativa entre as porcentagens de remoção do nitrogênio amoniacal entre as três fases de operação ( $p > 0,05$ ), indicando que houve uma estabilidade na remoção e que os eventos (inserção da amoxicilina e alteração do TDH) não interferiram no processo de remoção pela nitrificação.

A cinética do processo de nitrificação é limitada pela concentração de OD e de substrato, além de ser inibida pelo pH do meio e temperatura. Se o meio é alcalino ( $pH > 8,0$ ), o equilíbrio se desloca até a formação de amônia, favorecendo a atividade das bactérias oxidadoras de amônia (BOA). Já a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) é fortemente dependente da concentração de amônia, sendo que valores superiores a 1 mg.L<sup>-1</sup> N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> provocam um decréscimo exponencial da atividade das BON, enquanto que as BOA

só se inibem em concentrações superiores as  $150 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ . No entanto, em pHs menores de 6,0, tanto as BOA quanto as BON decrescem sua atividade (METCALF E EDDY, 2016). O MBR operou com pH do licor misto entre 6,6 a 6,9, ou seja, dentro da faixa de pH ótima recomendada para atuação dessas bactérias.

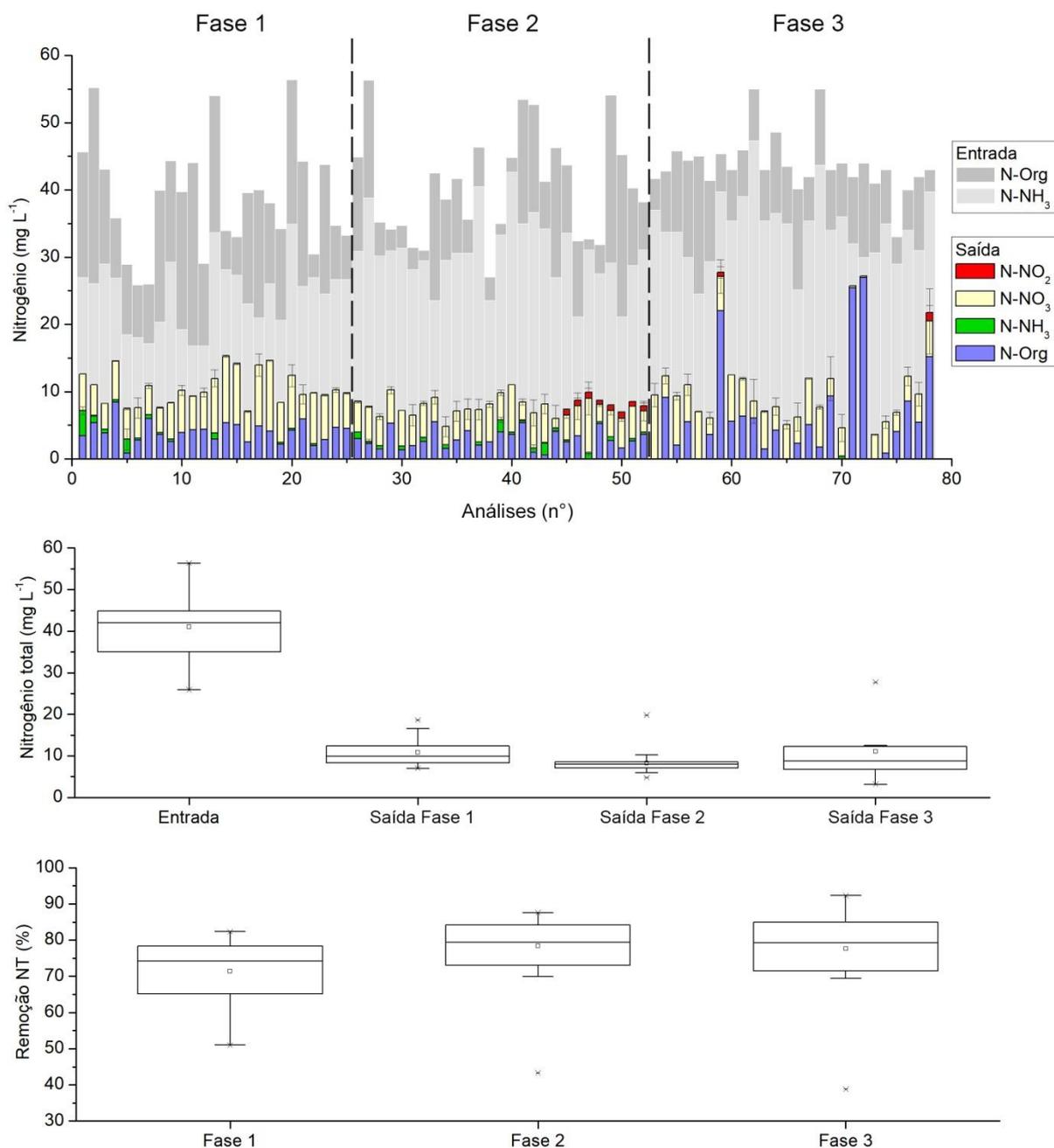
De acordo com Zhang *et al.* (2017), o oxigênio dissolvido é um dos parâmetros mais relevantes na nitrificação, já que concentrações menores que  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  podem limitar parcial ou totalmente a atividade das bactérias nitrificantes. Em síntese, a Figura 29 mostra os resultados do presente estudo, os quais indicam que a nitrificação ocorreu no sistema de forma quase completa, haja vista a remoção elevada de  $\text{N-NH}_4^+$  e elevada concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  gerado no efluente, mesmo com a variação do OD na Fase 3, mas que ainda manteve valores tipicamente acima do limitantes para a atividade biológica de BOA e BON. A presença de  $\text{N-NO}_3^-$  no permeado indica a atuação das bactérias BOA e BON e a eficiência no processo de nitrificação na zona aeróbia. Segundo Metcalf e Eddy (2016), a predominância de nitrato no efluente tratado é um indicativo que o esgoto está estabilizado em relação à demanda de oxigênio.

Adicionalmente, pode-se afirmar que a incorporação da concentração de amoxicilina no afluente não inibiu ou limitou o processo de remoção de amônia, uma vez que ele ocorreu de maneira análoga à Fase 1, com elevado TDH. É possível que a cinética tenha sido afetada ( $\text{mg}_{\text{NH}_4^+} \text{ g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), neste caso, seria interessante realizar um ensaio de respirometria autotrófica para fazer essa avaliação.

De modo geral, o monitoramento dos parâmetros do sistema de tratamento, principalmente de pH e OD, permite que o sistema MBR tenha capacidade de atuar simultaneamente na remoção biológica de nitrogênio, de matéria orgânica carbonácea e no tratamento de fármacos ou de outros compostos de interesse emergente presentes em afluentes.

A Figura 33 mostra a variação temporal das concentrações da série nitrogenada no período monitorado.

**Figura 33 – Concentração da série nitrogenada no permeado durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 78 amostragens).**



Fonte: Autora (2018).

Já a desnitrificação pode ser limitada pela quantidade de nitrato disponível e pelos parâmetros operacionais de OD, temperatura e relação carbono orgânico/nitrogênio (C:N) (ZOPPAS; BERNARDES; MENEGUZZI, 2016). No processo de desnitrificação, o nitrato gerado na nitrificação é reduzido a nitrogênio molecular e/ou óxido nítrico. Conforme visto anteriormente, a concentração de OD na zona anóxica ficou próxima a zero durante todo o período observado garantindo a atuação das bactérias heterotróficas na desnitrificação, já que níveis elevados de OD podem limitar o processo.

A capacidade de desnitrificar está relacionada com a quantidade de substrato biodegradável presente (relação carbono orgânico/nitrogênio) (ZHANG *et al.*, 2017). Geralmente, nos tratamentos biológicos de efluentes, numa relação carbono/nitrogênio (C:N, expressa geralmente como a razão DQO:N) maior do que 4, a taxa de desnitrificação se incrementa de um fator 1,5 a 1,7. Relações C:N menores do que 2,5 não possibilitam uma desnitrificação satisfatória, portanto, é necessária uma fonte externa de carbono para a remoção de nitrogênio do meio (HELMER-MADHOK *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2017). No caso do presente estudo, a razão C:N foi em torno de 20, calculado na concepção do sistema de forma a não limitar a desnitrificação. Meng *et al.* (2008) variaram o valor da relação C:N e observaram que em uma razão C:N elevada (15,1) a eficiência na remoção de nitrogênio total alcançou 67,8%.

Nos cenários em que são garantidos a eficiência da nitrificação, a concentração de OD próxima a zero e a relação C:N suficiente, a recirculação se torna o principal parâmetro que condiciona a ocorrência da desnitrificação e a consequente remoção de nitrogênio total. É possível afirmar que a recirculação do presente projeto (3x a vazão do permeado) é suficiente para suprir a quantidade de nitrato na câmara anóxica. Assim, pode-se verificar a ocorrência de desnitrificação dada a elevada redução de nitrogênio total (>72% em todas as fases) sem conversão a outras formas nitrogenadas.

A porcentagem de remoção do nitrogênio total apresentou diferenças significativas entre as Fases 1 e 2 ( $p < 0,05$ ). Dado que os parâmetros operacionais não foram alterados nas duas primeiras fases, a análise estatística indica que houve limitação na desnitrificação em decorrência à presença de amoxicilina ou à presença dos produtos de degradação, e como consequência, detectou-se de nitrito na Fase 2.

Na Fase 3, mesmo com o aumento da vazão de trabalho e redução de TDH, os parâmetros operacionais ainda garantiam as condições ótimas para a desnitrificação. Nota-se que nesta última fase, a eficiência de remoção foi de 77,6%. Wang, Huang e Yuan (2005) também operaram um MBR anóxico/aeróbio em condições similares e observaram que mesmo variando o TDH em 15, 10 e 6 horas a porcentagem de remoção de nitrogênio total permanecia em torno de 73%. A análise de variância mostrou que não há diferenças estatísticas entre as fases 2 e 3 ( $p > 0,05$ ), confirmando a hipótese de que a alteração do TDH não influenciou na remoção de nitrogênio total.

### 5.3.4. Remoção de fósforo

A Tabela 16 apresenta a concentração de fósforo total no esgoto sintético antes e após o tratamento por MBR.

**Tabela 15 – Concentração de fósforo total do afluente (entrada) e efluente (saída) nas três fases analisadas (n = 80 amostragens).**

P-Total (mg L <sup>-1</sup> )	Entrada					Saída					Remoção
	Média	D.P.	C.V.	Máx	Min	Média	D.P.	C.V.	Máx	Min	
Fase 1	<b>7,7</b>	1,6	20%	11,6	5,0	<b>6,5</b>	1,9	29%	10,0	3,3	<b>15,6 %</b>
Fase 2	<b>7,5</b>	1,3	18%	10,4	3,3	<b>6,2</b>	1,2	19%	8,5	3,1	<b>17,3 %</b>
Fase 3	<b>8,8</b>	2,5	28%	15,1	4,4	<b>5,3</b>	2,2	42%	11,6	2,7	<b>39,8 %</b>

Fonte: Autora (2018).

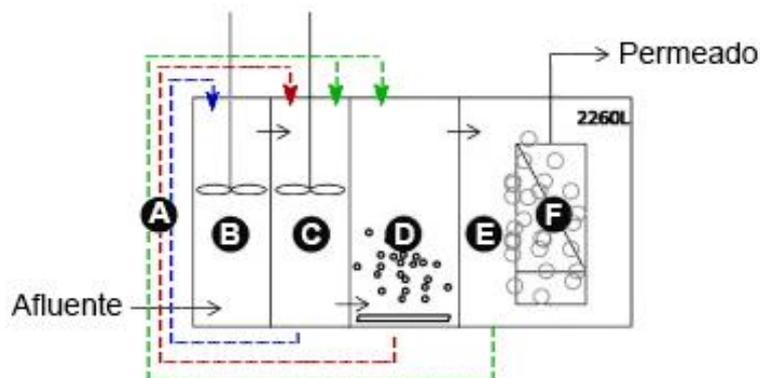
A análise pela ANOVA apontou que não há diferença estatísticas entre os valores de entrada ( $p > 0,05$ ) e de remoção entre as Fases 1 e 2 ( $p > 0,05$ ) para o fósforo total. Diferentemente do nitrogênio, nota-se um aumento significativo na remoção de fósforo total na Fase 3, provavelmente devido à maior remoção de fósforo via assimilação (1-2% em massa de sólidos), dado o maior teor de SSV na Fase 3.

Era esperada a baixa remoção de fósforo total, pois o biorreator não está configurado para remover este nutriente e sim, para remoção nitrogênio. Monclús *et al.* (2010) avaliaram a remoção de fósforo pelo sistema MBR e, para isso, a configuração do biorreator trabalhado continham as zonas anaeróbia, anóxica e aeróbia ocupando respectivamente 14%, 14% e 23% do volume de todo reator. Além disso, o MBR utilizado contava com um tanque anexo contendo as membranas que correspondia a 49% do volume total. Quanto à recirculação, o sistema possuía três linhas: (1) da zona anóxica para anaeróbia, (2) aeróbia para anóxica e (3) do tanque das membranas para anóxica e aeróbia, conforme pode ser observado na Figura 34.

O estudo conduzido por Monclús *et al.* (2010) mostraram que essa configuração de MBR é eficiente na remoção de carbono (96%) e fósforo total (89%). Além disso, o sistema também se mostrou eficiente na remoção de nitrogênio total (88%).

Embora o presente estudo não contemplasse o uso de uma zona anaeróbia, o MBR utilizado foi construído contendo três zonas (Figura 7). Alterando as configurações das linhas de recirculação e verificando a proporção do volume entre os tanques (%) para otimizar os TDHs de cada processo, seria possível realizar um projeto de pesquisa para investigar a remoção de nutrientes em geral do efluente, não apenas a série nitrogenada.

Figura 34 – Configuração de um sistema MBR para remoção de fósforo: (A) Recirculação; (B) Zona anaeróbia; (C) Zona anóxica; (D) Zona aeróbia; (E) Tanque das membranas; (F) Membranas.



(Fonte: Adaptado de Monclús, 2010)

### 5.3.5. Remoção de amoxicilina

A Tabela 17 apresenta a concentração de amoxicilina no afluente e efluente do MBR e a porcentagem de remoção.

Tabela 16 – Concentração de amoxicilina do afluente (entrada) e efluente (saída) nas duas fases analisadas (n = 52 amostragens).

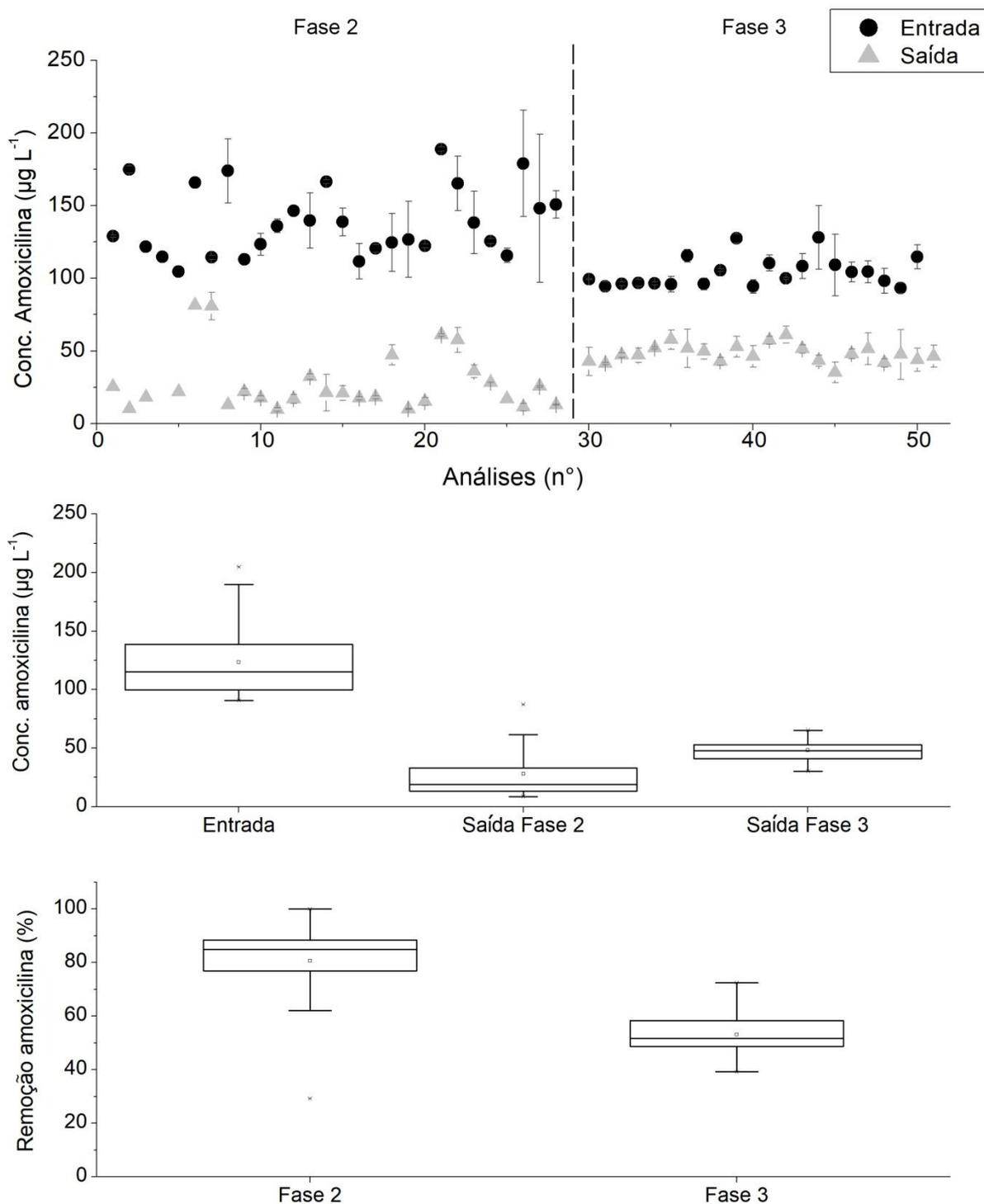
Amox ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Entrada					Saída					Remoção
	Média	D.P.	C.V.	Máx	Min	Média	D.P.	C.V.	Máx	Min	
Fase 2	<b>138,6</b>	23,7	17%	188,9	104,5	<b>27,7</b>	20,4	73%	81,5	9,6	<b>80,0 %</b>
Fase 3	<b>104,3</b>	10,3	10%	128,2	93,3	<b>48,1</b>	6,1	13%	61,2	35,3	<b>53,9 %</b>

Fonte: Autora (2018).

A Figura 35 mostra a série temporal da concentração de amoxicilina no esgoto sintético antes e após o tratamento pelo MBR.

A análise estatística mostrou que há variação significativa entre as Fases 2 e 3 em termos de concentração do antibiótico no permeado ( $p < 0,05$ ) e porcentagem de remoção ( $p < 0,05$ ). Portanto, a remoção do composto foi diferente para cada fase avaliada.

Figura 35 – Concentração de amoxicilina no afluente (entrada) e efluente (saída) do MBR durante o período monitorado e análise estatística dos resultados (n = 52 amostragens).



Fonte: Autora (2018).

A média de remoção da amoxicilina na Fase 2 (TDH = 40 h) foi aproximadamente de 80% e na Fase 3 (TDH = 20 horas), de 54%. Bai *et al.* (2012) avaliaram a remoção de amoxicilina de efluentes tratados por MBR com a variação do tempo de detenção hidráulica (25, 20, 15,10 e 6 horas), e observaram que, com a redução do TDH, houve a redução da

remoção do composto (49,1% a 26,3%). Observa-se, no presente estudo, uma relação proporcional na porcentagem de remoção ao reduzir o tempo de detenção hidráulica.

A relação proporcional entre TDH e eficiência de remoção de fármaco no tratamento por MBR também foi observado em um estudo conduzido por Tambosi *et al.* (2010), que verificaram que os antibióticos roxitromicina, sulfametoxazol e trimetoprim apresentaram, respectivamente, 57, 55 e 86% de remoção no MBR operando com TRS = 15 dias e TDH = 9 h e 81, 64, 94% de remoção no MBR com TRS = 30 dias e TDH = 13 h, mostrando que houve maiores porcentagens de remoções no cenário com maior TRS e TDH.

Prasertkulsak *et al.* (2016) investigaram a degradação de 11 compostos farmacêuticos no sistema MBR operando com TDH = 3 h e SST = 13 g L<sup>-1</sup>, ou seja, baixo TDH e alta concentração de biomassa, e obtiveram elevadas porcentagens de remoção dos antibióticos Sulfametoxazol (78%) e Trimetoprim (80%). Entretanto, não é possível estabelecer a mesma relação no atual projeto, pois, com a redução do TDH e consequente aumento dos SST na Fase 3 houve um aumento na concentração de amoxicilina no permeado, indicando que a porcentagem de remoção foi menor e reforçando a relação entre a remoção e o tempo de contato da biomassa com o composto.

Labinghisa e Rollon (2014) utilizaram um sistema MBR para avaliar a remoção de ampicilina, outro tipo de antibiótico  $\beta$ -lactâmico penicilínico e observaram maior porcentagem de remoção do composto em condições com nitrificação (87,6%) do que na ausência do processo (78,1%). Sendo a amoxicilina um antibiótico também pertencente ao grupo das penicilinas e  $\beta$ -lactâmicos, é possível que o processo de nitrificação na zona aeróbia tenha contribuído para sua biodegradação.

Marcelino *et al.* (2016) avaliaram a remoção de amoxicilina oriunda de esgoto real de indústria farmacêutica por biodegradação aeróbia (com lodo proveniente de sistema de lodos ativados) e anaeróbia (com lodo de sistema UASB). As eficiências de remoção dos processos aeróbicos e anaeróbicos foram, respectivamente, 89% e 63% de Carbono Orgânico Total e 80% e 50% de amoxicilina.

Tran *et al.* (2016) compararam o sistema MBR com lodos ativados convencional (LAC) em remover 21 agentes antimicrobianos de dez diferentes classes. O MBR mostrou-se mais eficiente em remover trimetoprima, triclosan e triclocarban e outros antibióticos pertencente às classes de lincosamidas, sulfonamidas, macrolídeos e tetraciclina. Não houve diferença entre LAC e MBR na remoção de  $\beta$ -lactâmicos (dentre eles, amoxicilina), cloranfenicol, ciprofloxacina e vancomicina e a remoção de eritromicina foi melhor em LAC que em MBR (TRAN *et al.*, 2016).

#### 5.4. Mecanismos de remoção da amoxicilina pelo MBR

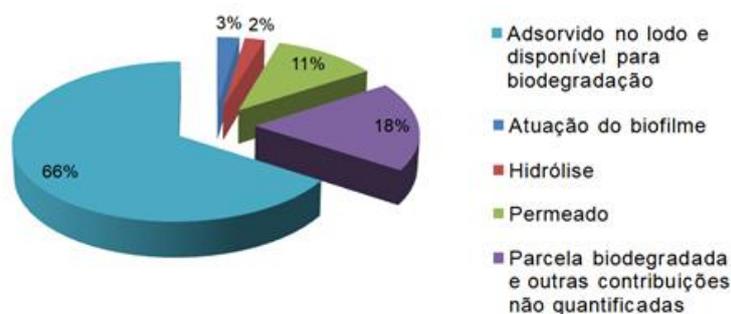
A Tabela 18 apresenta a concentração média de amoxicilina disponível em cada processo envolvido no tratamento pelo sistema MBR. A Figura 36 mostra as porcentagens relacionadas a cada mecanismo na remoção do fármaco, considerando que se trata de um sistema fechado.

**Tabela 17 – Concentração (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de amoxicilina nos diferentes processos de tratamento do sistema MBR (n = 2 replicatas).**

Mecanismo	Concentração média ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Desvio Padrão ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Entrada	131,28	3,40
Adsorvido no lodo e disponível para biodegradação	86,36	1,38
Atuação do biofilme	3,15	2,50
Hidrólise	2,85	0,40
Permeado	14,89	1,09
Parcela biodegradada e outras contribuições não quantificadas	24,03	2,47

Fonte: Autora (2018).

**Figura 36 – Porcentagem de amoxicilina nos diferentes processos de tratamento do MBR.**



Fonte: Autora (2018).

No processo de hidrólise, o anel  $\beta$ -lactâmico da amoxicilina “sofre” o ataque do nucleófilo  $\text{H}_2\text{O}$  que promove a abertura do anel (ANDREOZZI *et al.*, 2004). Dentre os mecanismos avaliados, a hidrólise contribui pouco (2%) para a remoção da amoxicilina. Xu *et al.* (2011) também investigaram a hidrólise da amoxicilina e verificaram que esta é responsável por 5 a 18% de perda do composto em soluções com diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida.

Observa-se que a maior parte da amoxicilina que entra no sistema fica disponível no lodo (66%) para adsorção ou para biodegradação. Isso mostra que o principal mecanismo de remoção da amoxicilina pelo MBR é a atuação da biomassa. O biofilme formado na superfície da membrana também contribui (cerca de 3%) na remoção do fármaco também

biodegradando ou adsorvendo o composto. Não foi realizado o ensaio de adsorção devido à prévia exposição do lodo ao antibiótico que comprometeu a avaliação da cinética de adsorção.

Embora tenha baixa solubilidade em água, a molécula da amoxicilina é polar e, segundo as definições de Fan *et al.* (2014) e Besha *et al.* (2017), este antibiótico tende a ser favorável a ser removido por biodegradação. A eficiência da biodegradação de micropoluentes pela biomassa do MBR depende de diversas variáveis de operação do sistema, tais como: tempo de detenção hidráulica (TDH), tempo de retenção dos sólidos (TRS), temperatura, pH, concentração da biomassa e as características do composto (BOONNORAT *et al.*, 2016). Variações desses parâmetros, especialmente o TDH, influenciam na comunidade bacteriana existente no biorreator e, conseqüentemente, na degradação dos micropoluentes e no desempenho do tratamento do esgoto (WIN *et al.*, 2016).

Bai *et al.* (2012) empregaram um modelo dinâmico para avaliar os mecanismos de remoção de amoxicilina e obtiveram as constantes de hidrólise ( $0,072 \text{ d}^{-1}$ ), de adsorção ( $0,096 \text{ d}^{-1}$ ) e de biodegradação ( $0,24 \text{ d}^{-1}$ ). Cunningham e Lin (2010) aplicaram um modelo cinético de pseudo-primeira ordem e alcançaram as seguintes constantes:  $0,078 \text{ d}^{-1}$  para hidrólise,  $0,083 \text{ d}^{-1}$  para sorção e  $0,130 \text{ d}^{-1}$  para biodegradação. Essas constantes sugerem que a biodegradação é o mecanismo predominante na remoção do antibiótico. Convertendo as porcentagens encontradas no presente estudo, tem-se que a taxa de biodegradação conjunto da adsorção é de  $0,396 \text{ d}^{-1}$  e da hidrólise,  $0,012 \text{ d}^{-1}$ . Embora a taxa de hidrólise calculada seja menor do que as encontradas na literatura, nota-se que o valor relacionado à biodegradação/sorção corrobora com a soma das taxas de biodegradação e adsorção das referências citadas.

No entanto, um estudo conduzido por Marcelino *et al.* (2016) contradiz os resultados encontrados pelos pesquisadores citados acima. Um ensaio de dessorção realizado em lodo de sistema aeróbio e anaeróbio, que tratavam esgoto de indústria farmacêutica, mostrou que a remoção de 80% (aeróbio) e 50% (anaeróbio) de amoxicilina foi pelo mecanismo de adsorção e não necessariamente pela biodegradação.

A eficiência de remoção dos micropoluentes emergentes pelos diferentes tipos de tratamentos biológicos depende, principalmente, das características físico-químicas e da estrutura molecular do composto alvo. A presença de cloro e a quantidade de anéis aromáticos torna a molécula mais complexa e difícil de ser removida (KIMURA *et al.*, 2005). Por exemplo, o coeficiente de partição carbono orgânico/água da carbamazepina ( $\log K_{oc} = 2,26\text{--}3,48$ ) e do diclofenaco ( $\log K_{oc} = 2,20\text{--}3,4$ ) (PAL *et al.*, 2010) são parecidos com da amoxicilina ( $\log K_{oc} = 2,94$ ), mas têm estrutura molecular mais complexa, o que torna mais

difícil sua remoção por processos biológicos. Carbamazepina, diazepam e diclofenaco contêm dois anéis aromáticos e, os dois últimos, também cloro em sua estrutura molecular.

O coeficiente de partição carbono orgânico/água do ibuprofeno ( $\log K_{oc} = 1,82-3,12$ ) (PAL *et al.*, 2010) também é comparável ao da amoxicilina, mas sua estrutura mais simples permite que seja facilmente biodegradado. Remoções de bisfenol-A, ibuprofeno e bezafibrato foram superiores a 90% em MBR monitorado por Clara *et al.* (2005).

Os resultados obtidos corroboram o elevado valor de coeficiente de partição carbono orgânico/ água do composto ( $K_{oc} = 2,94$ ), o qual indica que a afinidade da amoxicilina na biota do MBR é maior do que na fase aquosa, estando mais disponível para a adsorção na biomassa e conseqüente biodegradação (KIM *et al.*, 2016). Uma tentativa de calcular o coeficiente de partição carbono orgânico/ água ( $K_{oc}$ ) a partir dos resultados deste experimento permite obter  $K_{oc}=5,80$ . Comparado ao valor encontrado na literatura, a constante determinada é mais elevada demonstrando que há algum erro na variável adotada. O erro cometido foi, provavelmente, considerar a concentração de amoxicilina que permanece no permeado após passar pela membrana ultrafiltração como a porção do composto presente na fase aquosa. O método 2540 de APHA (2016), relacionado à análise de sólidos, considera a porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  como o corte da granulometria dos sólidos suspensos. Assim, a concentração do composto presente na fase aquosa deveria ser representada pela parcela filtrada em 0,45  $\mu\text{m}$  e não pela membrana de UF de porosidade 0,1  $\mu\text{m}$ .

A elevada qualidade do efluente tratado por MBR permite utilizá-lo em recarga de águas subterrâneas e em reúso urbano, industrial ou agrícola, pois as membranas comumente usadas são de micro e ultrafiltração, que garantem a retenção de sólidos suspensos e a desinfecção (JUDD, 2011). Mas de acordo com Taheran *et al.* (2016), a massa molar de corte dessas membranas é em torno de 100 kDa e, por isso não, são capazes de remover a maioria dos compostos farmacologicamente ativos, cuja massa molar varia de apenas 200 a 800 Da. Os fármacos podem ser eficientemente removidos pelas membranas de osmose reversa, no entanto, seu alto custo de implementação dificulta a vasta aplicação (TAHERAN *et al.*, 2016). Assim, avalia-se que, para elevar a eficiência de remoção da amoxicilina pelo sistema de MBR, seria necessário combinar um pós-tratamento utilizando processos oxidativos avançados ou adsorção em carvão ativado.

Clara *et al.* (2005) observaram que as membranas de ultrafiltração de um sistema piloto de MBR não promoveram retenção adicional dos compostos investigados (oito fármacos, duas fragrâncias e nove disruptores endócrinos) devido à exclusão de tamanho, mesmo variando os tempos de retenção de sólidos. Gebhardt e Schröder (2007) também observaram que um sistema MBR (porosidade da membrana = 0,4  $\mu\text{m}$ ) não foi capaz de

remover concentrações de 0,006 a 1,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de carbamazepina, diazepam, diclofenaco e ácido cloffbrico presentes em águas residuárias municipais. A eliminação completa dos compostos se deu com a aplicação MBR em combinação com processos oxidativos avançados (GEBHARDT; SCHRÖDE, 2007). É possível que a membrana de ultrafiltração do MBR de Gebhardt e Schröder (2007) também não tenha promovido retenção adicional, mostrando a necessidade de utilizar processos oxidativos avançados ou adsorção para aumentar os níveis de remoção dos compostos.

Dessa maneira, é possível afirmar que a membrana não contribuiu para a remoção da amoxicilina, pois a massa molar de corte de membranas de ultrafiltração é de 100 kDa (TAMBOSI, 2010) e a molar da amoxicilina é 365,4  $\text{g mol}^{-1}$  (ou 0,365 kDa).

Besha *et al.* (2017) fizeram um levantamento bibliográfico e observaram que o fármaco carbamazepina também tem baixa remoção no tratamento por MBR (<20%), entretanto, a porcentagem de remoção foi maior em MBR integrado a sistema de nanofiltração (93%), de osmose reversa (>99%) e a adsorção em carvão ativado (>99%). Assim, para reduzir a concentração de amoxicilina no permeado do MBR seria necessário integrá-lo a outro sistema avançado de tratamento, como nanofiltração, osmose reversa, adsorção em carvão ativado ou processos oxidativos avançados.

No ensaio também foi observado que houve uma porcentagem de outras contribuições que não foram quantificadas (18%) da concentração de amoxicilina inicial. Essa porcentagem refere-se à parcela biodegradada, aos eventuais erros analíticos, volatilização e outros mecanismos não avaliados. Embora não seja possível afirmar que houve volatilização do antibiótico, sobretudo devido à sua baixa pressão de vapor (Constante de Henry para amoxicilina =  $1,08 \times 10^{-10} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) (CUNNINGHAM; LIN, 2010), é importante lembrar que existe alguma contribuição.

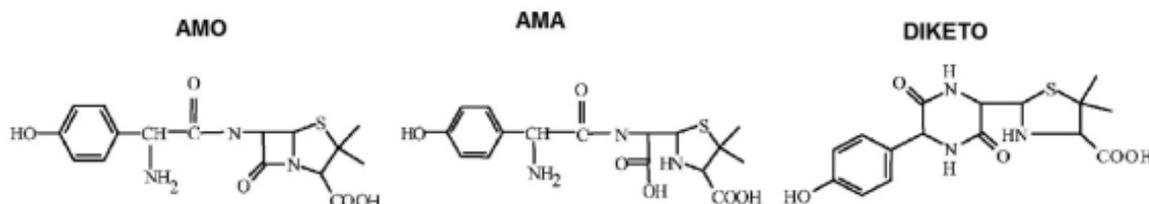
## 5.5. Produtos de degradação

A molécula de amoxicilina (AMO) tem uma estrutura com três centros quirais, o que explica a existência de oito isômeros opticamente ativos. No entanto, apenas uma das formas de AMO possui atividade antibacteriana. Além disso, a presença de um anel  $\beta$ -lactâmico torna esta molécula facilmente clivável, o que explica a sua conversão em dois metabólitos principais: o ácido amoxiciloico (AMA) e a amoxicilina diketo-piperazina-2,5-diona (DIKETO) (DESCHAMPS *et al.*, 2012).

A Figura 37 mostra a estrutura desses principais metabólitos da amoxicilina. Dependendo do pH do meio, a hidrólise formará mais de um dos subprodutos: no meio ácido, a hidrólise da AMO pode levar à formação de DIKETO, enquanto que em meios mais

alcalinos a hidrólise da amoxicilina leva à formação preponderante do AMA (DESCHAMPS *et al.*, 2012).

**Figura 37 – Estrutura química da amoxicilina (AMO) e seus metabólitos ácido amoxicilóico (AMA) e amoxicilina diketopiperazina-2,5-diona (DIKETO).**



Fonte: DESCHAMPS *et al.* (2012)

A quantificação de antibióticos do tipo  $\beta$ -lactâmicos podem ser prejudicada devido à formação desses metabólitos: os anéis  $\beta$ -lactâmicos são suscetíveis à hidrólise devido à sua tendência para desestabilizar e também devido à eletrofilia com compostos carbonílicos eventualmente presentes na matriz de uma amostra. Em alguns métodos analíticos relatados na literatura, muitos desses antibióticos mostram baixa taxa de recuperação (<30%) e incapacidade de detecção dos analitos em virtude desses processos de conversão (WATKINSON *et al.*, 2007). Outros produtos ainda podem ser formados em decorrência dessas reações de ataque nucleofílico por componentes presentes na matriz da amostra, gerando uma infinidade de subprodutos da amoxicilina.

Nesse sentido, justifica-se a necessidade da identificação dos compostos por sistemas de detecção do tipo espectrômetros de massa de alta resolução, de modo a fornecer uma melhor confirmação dos compostos detectados e minimizar falsos negativos. No que tange o presente trabalho, poderia se creditar a diminuição da amoxicilina no efluente tratado, mas o que de fato ocorreu foi a sua conversão à outra forma hidrolisada. Dentre esses produtos, sabe-se, por exemplo, que AMA tem um potencial alergênico muito superior a AMO e DIKETO (REYNS *et al.*, 2008) e pouco se estudou quanto a níveis seguros desses metabólitos no ambiente.

A Tabela 19 apresenta as concentrações médias dos produtos de degradação encontrados nas amostras de entrada (afluente) e saída (efluente) das Fases 2 e 3.

Tabela 18 – Produtos de degradação da amoxicilina no afluente (entrada) e efluente (saída) das fases 2 e 3.

Subproduto	Concentração média ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			Massa/Carga (m/z)	Tempo de retenção (min)
	Entrada	Fase 2	Fase 3		
Ácido peniciloico amoxicilínico	0,22 ± 0,03	n.d.	n.d.	189,0694	4,4
Ácido peniloico amoxicilínico I	0,74 ± 0,45	n.d.	n.d.	189,0693	5,0
Ácido peniloico amoxicilínico II	0,27 ± 0,17	n.d.	n.d.	189,0693	5,5
Amoxicilina diketo-piperazina-2,5-diona	0,46 ± 0,01	n.d.	n.d.	160,0428	7,1
Pirazinona	0,19 ± 0,03	n.d.	n.d.	145,0760	7,7

\*n.d. = não detectável, abaixo do limite de quantificação.

Fonte: Autora (2018).

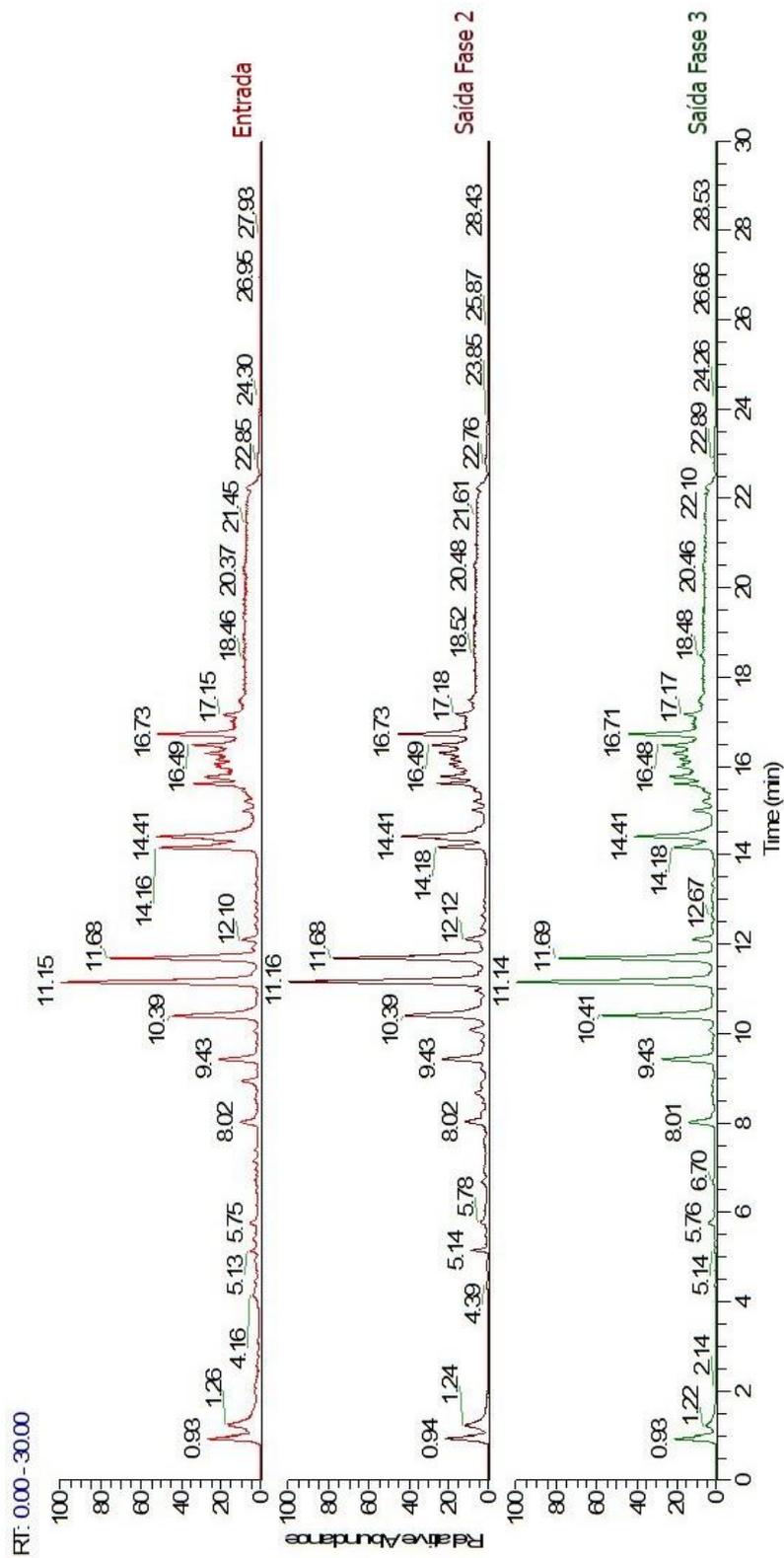
Segundo Nägele e Moritz (2005), a amoxicilina pode ser degradada por dois caminhos: (1) com a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico e produzindo “Ácido amoxicilóico” no processo de hidrólise; (2) sofrendo um ataque nucleofílico de sua própria molécula, em que o grupo amino livre ataca o grupo carbonila benzílico e formando o “4-hidroxfenigilil amoxicilina”. O “Ácido penicilóico amoxicilínico” por sua vez também pode apresentar duas vias de degradação: (1) sofrendo uma descarboxilação do ácido carboxílico livre, formando compostos estereoisoméricos “Ácido penilóico amoxicilínico I e II”; (2) formando um novo anel estável dando origem ao “Amoxicilina diketopiperazina” (NÄGELE; MORITZ, 2005).

Nota-se na Tabela 19 que os produtos de degradação foram quantificados apenas no afluente ao MBR, podendo indicar que a molécula de amoxicilina se decompõe antes do processo de tratamento, no tanque de alimentação, por onde são coletadas as amostras para análises. Gozlan, Rotstein e Avisar (2013) afirmam que a amoxicilina sofre hidrólise rapidamente e, na presença de íons bivalentes (como  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ), o anel  $\beta$ -lactâmico se abre formando os outros subprodutos.

Gozlan, Rotstein e Avisar (2013) detectaram, em efluente secundário, os produtos de degradação “Ácido penilóico amoxicilínico” ( $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e “Amoxicilina diketopiperazina” ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), “Ácido penilóico amoxicilínico” e “Fenol hidroxipirazina” também foram detectados, mas não quantificados. O subproduto DIKETO também foi determinado em águas subterrâneas em concentrações da ordem de  $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ . Esses resultados reforçam que os tratamentos convencionais das estações de tratamento de esgoto não removem os produtos de degradação da amoxicilina, entretanto, no permeado do MBR não foi possível quantificar concentrações dos subprodutos do antibiótico e sim do composto com razão m/z = 366, que corresponde à somatória das formas AMO + AMA + DIKETO.

A Figura 38 mostra o cromatograma da análise dos subprodutos feita por LCMS.

Figura 38 - Cromatograma da análise dos produtos de degradação da amoxicilina.



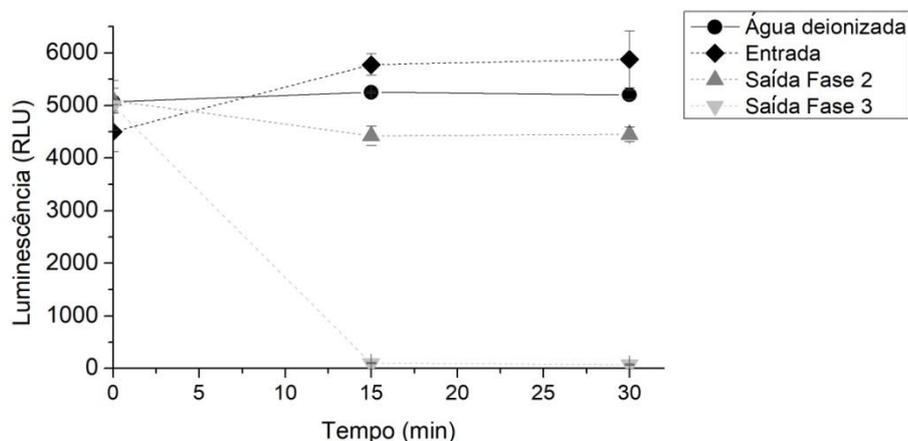
Fonte: Autora (2018).

## 5.6. Ensaios ecotoxicológicos com amostras provenientes do MBR

### 5.6.1. *Vibrio fischeri*

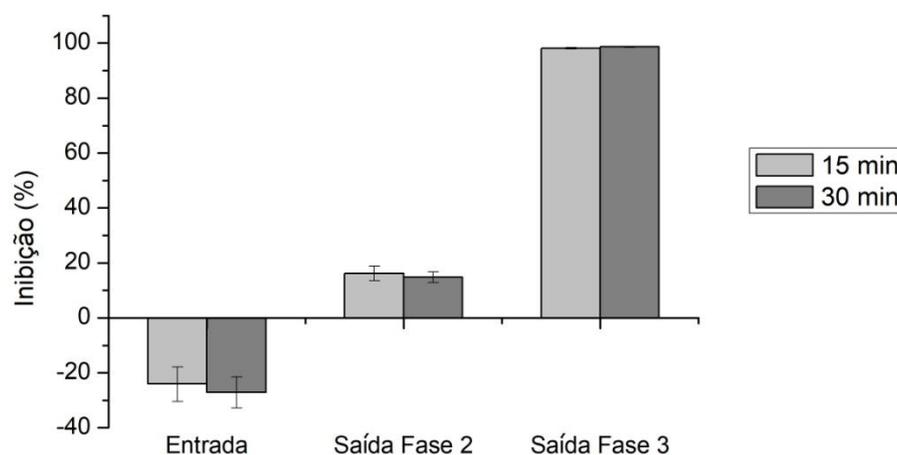
A Figura 39 mostra a luminescência dos organismos ao longo do tempo em água deionizada, efluente sintético bruto (entrada) e permeado das fases 2 e 3 do projeto. A Figura 40 apresenta a porcentagem de inibição do organismo *Vibrio fischeri* após 15 e 30 minutos de contato com as amostras em relação ao sistema controle (água deionizada).

**Figura 39 - Luminescência em amostras das fases 2 e 3 do sistema MBR ao longo do tempo (n = 3 replicatas).**



Fonte: Autora (2018).

**Figura 40 – Porcentagem de inibição da luminescência de *Vibrio fischeri* após 15 e 30 minutos de exposição a amostras do sistema MBR, comparados ao sistema controle de água deionizada (n = 3 replicatas).**



Fonte: Autora (2018).

Os valores negativos na Figura 40 indicam que, comparados à água deionizada, a composição do afluente (entrada) promoveu uma estimulação no metabolismo da bactéria após 15 e 30 minutos de exposição à amostra, apresentando, respectivamente, um valor médio de 24 e 27%. O aumento da luminescência pode ser observado na Figura 39. O esgoto

sintético bruto é composto por diversos macro e micro nutrientes, cujos efeitos no organismo-teste se sobressaíram frente à concentração de amoxicilina presente.

O efluente tratado durante a Fase 2 do sistema apresentou uma inibição média de aproximadamente 15% em relação à água deionizada. Isso pode indicar que a quantidade residual do antibiótico (em média de  $28 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e dos subprodutos provocou um impacto no metabolismo das bactérias fazendo com que reduzissem sua luminescência.

O metabolismo do *Vibrio fischeri* sofreu grande influência pela amostra da saída da Fase 3, sendo possível observar o rápido decaimento da luminescência na Figura 37 e elevada inibição (em torno de 98%) na Figura 40 quando comparado ao sistema controle de água deionizada. A terceira fase corresponde ao aumento da vazão no sistema e, de acordo com os resultados, o efluente tratado na Fase 3 apresentou em sua composição uma quantidade maior de amoxicilina (em média de  $48 \mu\text{g L}^{-1}$ ) correspondendo à maior porcentagem de inibição da luminescência.

Vasconcelos, Dalke e Oliveira (2017) confirmaram a relação proporcional de inibição e concentração de quatro antibióticos: variando as concentrações dos compostos de 3,9 a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  e expondo o organismo por 30 min, a porcentagem inibição da luminescência do *Vibrio fischeri* aumentou de 0,96% para 15% para trimetoprim, de 3,21% para 25% para metronidazol, de 4,70% para 90% para nitrofurantoína e de 13,65% para 90% para sulfametoxazol.

Park e Choi (2008) determinaram o valor de  $\text{IC}_{50} = 3597 \text{ mg L}^{-1}$  da amoxicilina que correspondente à metade da concentração inibitória máxima para o *Vibrio fischeri*. Os mesmos autores também compararam o nível de toxicidade frente a outros antibióticos (a saber: sulfametazina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfadimetoxina, sulfatiazol, trimetoprim, sulfametoxazol e enrofloxacina) e observaram que os  $\beta$ -lactâmicos ampicilina e amoxicilina apresentaram os níveis mais baixos de toxicidade para o *Vibrio fischeri*. Assim, a inibição quase total da luminescência da bactéria no efluente da Fase 3 pode indicar que o organismo-teste também é influenciado pelo residual dos compostos ainda presentes no permeado, evidenciando como o efeito de interação do composto com a matriz pode influenciar na toxicidade de uma amostra, especialmente em decorrência da formação de possíveis subprodutos por reações nucleofílicas.

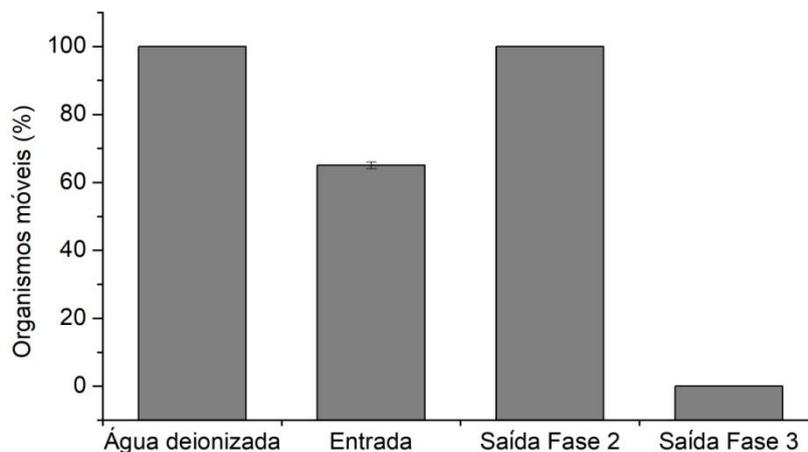
A amoxicilina é um antibiótico de grande espectro de atuação, atingindo bactérias gram-positivas e gram-negativas (BAGHAPOUR *et al.*, 2014). A bactéria *Vibrio fischeri* pertence à família dos *Vibrionaceae* e são Gram-negativas (RUBY *et al.*, 2005) e, portanto, são alvo de atuação da amoxicilina e outros antibióticos.

Ioele, Luca e Ragno (2016) mediram a bioluminescência da bactéria *Vibrio fischeri* quando expostas a treze antibióticos: clorotetraciclina, oxitetraciclina, ofloxacina, norfloxacino, ácido oxolínico, ácido nalidíxico e estreptomicina apresentaram elevada toxicidade aguda para concentrações acima de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  após 30 minutos de exposição inibindo completamente o metabolismo da bactéria; clindamicina, neomicina, ampicilina e amoxicilina inibiram menos de 20% da bioluminescência mesmo em concentrações altas ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e os antibióticos eritromicina e sulfametoxazol estimularam a bioluminescência (109% e 120% respectivamente) quando comparados ao controle de água deionizada (IOELE; LUCA; RAGNO, 2016).

### 5.6.2. *Daphnia magna*

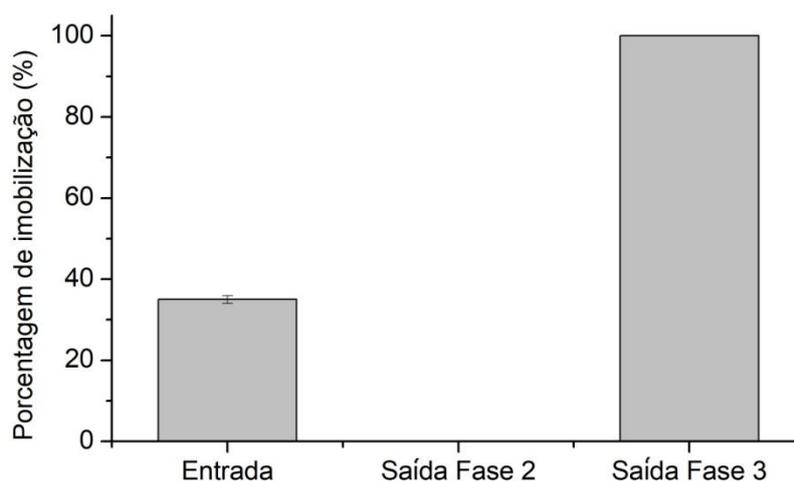
A porcentagem de organismos móveis e nadantes após 48 horas em contato com as amostras estão apresentados na Figura 41, e porcentagem de imobilização da *Daphnia magna* está apresentada na Figura 42.

**Figura 41 – Porcentagem de *Daphnia magna* móveis e nadantes após 48 horas de exposição às amostras do sistema MBR (n = 20 organismos).**



Fonte: Autora (2018).

**Figura 42 – Porcentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 48 horas de exposição às amostras do sistema MBR (n = 20 organismos).**



Fonte: Autora (2018).

Em água deionizada, todas as *Daphnias* continuaram móveis. Já a amostra de entrada, correspondente ao esgoto sintético bruto, imobilizou, em média, 35% dos crustáceos. A amostra da Fase 2 não promoveu imobilização, em contrapartida, o permeado da Fase 3 imobilizou 100% dos organismos. Isso indica que a mudança da vazão no processo de tratamento, que culminou na alteração da composição do efluente tratado, repercutiu em maior efeito ecotoxicológico no organismo-alvo. O resultado da amostra da Fase 3 corrobora com os resultados do teste de *Vibrio fischeri*, em que houve maior porcentagem de inibição com esta mesma amostra.

Os organismos *Daphnia magna* são crustáceos planctônicos e, embora não sejam alvos, podem estar sujeitos à ação dos antibióticos. Os antibióticos são compostos potencialmente tóxicos que podem impactar nos efeitos agudos de mobilidade do organismo, como mostraram os testes com nove antibióticos realizados por Wollenberger, Hallingsørensen e Kusk (2000).

A concentração prevista da amoxicilina que não cause efeito (PNEC, do inglês “*Predicted no-effect concentration*”) em toxicidade aguda para as *Daphnias* é  $PNEC=0,0073 \mu\text{g L}^{-1}$  (PARK; CHOI, 2008). As concentrações residuais do antibiótico detectadas no MBR são superiores ao PNEC (Fase 2 =  $27,7 \mu\text{g L}^{-1}$  e Fase 3 =  $48,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sugerindo que as respostas de imobilização do organismo estejam relacionadas às concentrações do antibiótico. Park e Choi (2008) também investigaram o valor de  $EC_{50}$  da amoxicilina para a imobilização da *Daphnia magna*, porém não foi possível obter uma concentração exata e observaram que o  $EC_{50}$  tende a ser superior a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

É possível que a concentração inicial de amoxicilina (aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) causasse um efeito negativo na mobilidade dos organismos e que a composição do esgoto sintético bruto, por si só, já ocasionasse um efeito positivo competindo com o fármaco, resultando em 35% de imobilização na amostra de entrada. Com o tratamento do esgoto e a redução da concentração das diversas substâncias monitoradas e da amoxicilina, provavelmente, a amostra de saída da Fase 2 não tenha causado efeitos nos crustáceos. Com exceção do carbono orgânico dissolvido e nitrogênio orgânico, os demais parâmetros monitorados não tiveram suas concentrações residuais significativamente elevadas ao aumentar a vazão de trabalho do MBR, já a amoxicilina teve sua concentração duplicada. Esse aumento pode justificar a total imobilização das *D. magna*.

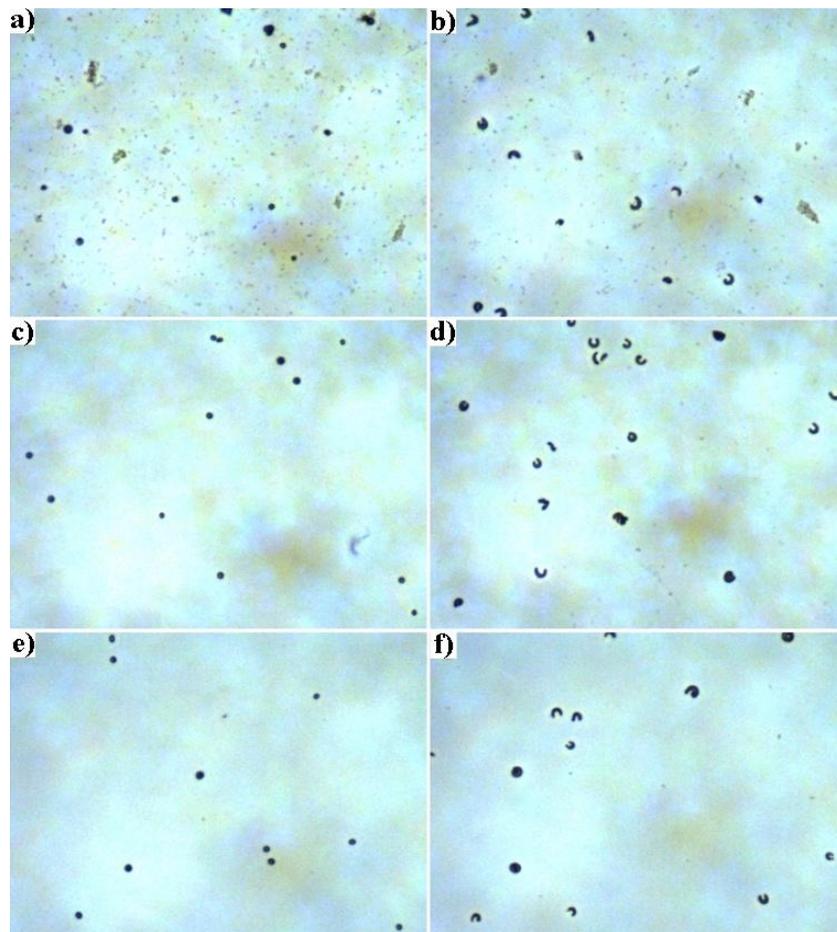
O organismo *Daphnia magna* também pode ser utilizado nos ensaios de toxicidade crônica seguindo a metodologia OECD 211 que avalia a reprodução em um longo tempo de exposição ao composto. Entretanto, apesar de não ter sido possível avaliar a amoxicilina em ensaios de toxicidade crônica, GUO *et al.* (2016) ranquearam a toxicidade potencial de fármacos de diferentes classes terapêuticas e verificou que, em ambientes aquáticos, a amoxicilina apresentou elevado grau de toxicidade aguda.

Kim *et al.* (2017) avaliaram a toxicidade aguda e crônica de cefadroxil e cefradina, antibióticos da classe das cefalosporinas, em *Daphnia magna*. Foi observado o efeito agudo de imobilização em concentrações superiores a  $100 \text{mg L}^{-1}$  de ambos os antibióticos, efeito crônico no crescimento acima de  $39 \text{mg L}^{-1}$  de cefradina e efeito crônico na reprodução acima de  $83 \text{mg L}^{-1}$  de cefadroxil (KIM *et al.*, 2017).

### **5.6.3. Algas *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcaptata***

A Figura 43 mostra imagens microscópicas (objetiva de 20x) das células de *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcaptata* nas amostras provenientes do sistema MBR. Nota-se que as amostras de entrada contêm uma grande quantidade de sólidos e das Fases 2 e 3 há pouca interferência visual.

**Figura 43 – Imagem por microscopia (objetiva 20x) das algas após 24 horas de exposição às amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris* em efluente sintético bruto; (B) *Raphidocelis Subcaptata* em efluente sintético bruto; (C) *Chlorella vulgaris* em permeado da Fase 2; (D) *Raphidocelis Subcaptata* em permeado da Fase 2; (E) *Chlorella vulgaris* em permeado da Fase 3; (F) *Raphidocelis Subcaptata* em permeado da Fase 3.**



Fonte: Autora (2018).

A Figura 44 mostra imagens dos frascos utilizados para o ensaio contendo as algas e amostras após 96 horas de exposição. Nota-se que a cor da amostra de entrada (identificada por “E” nos frascos) é visualmente mais forte, indicando maior concentração de células, tanto para *Chlorella* quanto para *Raphidocelis*.

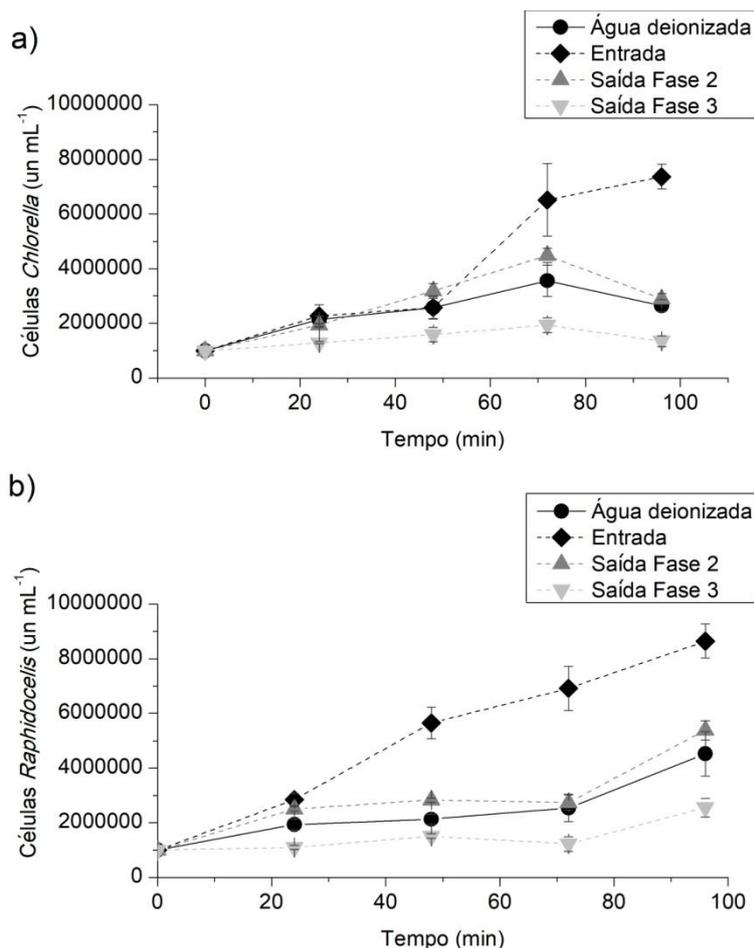
Figura 44 – Imagem das algas após 96 horas de exposição às amostras do sistema MBR. (A) *Chlorella vulgaris* em água deionizada, efluente sintético bruto, permeado da Fase 2 e permeado da Fase 3; (B) *Raphidocelis Subcaptata* em água deionizada, efluente sintético bruto, permeado da Fase 2 e permeado da Fase 3.



Fonte: Autora (2018).

A Figura 45 mostra a cinética de crescimento das algas em 96 horas de contato com amostras do MBR.

Figura 45 – Cinética do crescimento das algas em amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris*; (B) *Raphidocelis subcaptata* (n = 4 replicatas).

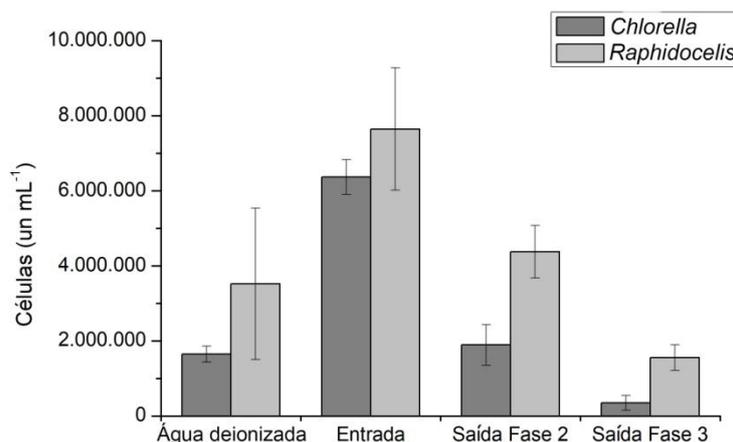


Fonte: Autora (2018).

É possível observar, que para ambas as algas, o crescimento das células foi maior na amostra da entrada (esgoto sintético bruto), sendo que para *Chlorella* (Figura 45-A) o crescimento foi mais rápido após 48 horas e para *Raphidocelis* (Figura 45-B), após 24 horas de exposição. Embora na Fase 2 tenha ocorrido um crescimento maior que o sistema controle (água deionizada), na Fase 3 houve uma inibição do crescimento para ambas as algas. É importante lembrar que foram adicionados nutrientes às amostras de forma que não fosse limitante ao crescimento das algas. Assim, a inibição ocorrida no permeado da Fase 3 indica que a composição residual da amostra apresenta certa toxicidade para os organismos.

A Figura 46 apresenta um perfil da concentração de células das algas que cresceram em 96 horas.

**Figura 46 – Concentração de células das algas crescidas (unidades mL<sup>-1</sup>) em 96 horas de exposição às amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris*; (B) *Raphidocelis Subcaptata* (n = 4 replicatas).**



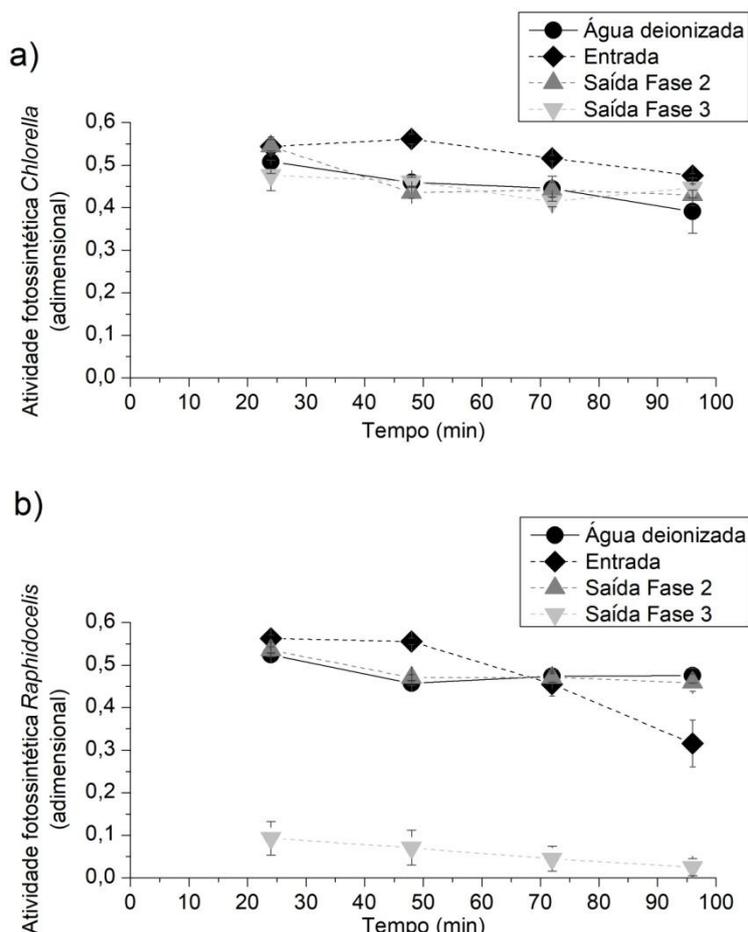
Fonte: Autora (2018).

Nota-se que o desenvolvimento da *Raphidocelis* foi maior para todas as amostras testadas, entretanto, a resposta para cada amostra foi similar à *Chlorella*: o número de células das algas foi maior na amostra da entrada e reduzida na Fase 3.

É possível observar também a superestimulação do crescimento de ambas as espécies na amostra de entrada em relação ao controle de água deionizada que está associada à presença de nutrientes (fósforo e nitrogênio) no esgoto sintético bruto. O menor crescimento das algas na amostra de saída da Fase 2 também está relacionado às menores concentrações desses nutrientes, que foram parcialmente removidos durante o processo pelo MBR.

A Figura 47 mostra a cinética da atividade fotossintética da (A) *Chlorella* e (B) *Raphidocelis*.

**Figura 47 – Cinética da atividade fotossintética das algas em amostras do sistema MBR: (A) *Chlorella vulgaris*; (B) *Raphidocelis Subcaptata* (n = 4 replicatas).**



Fonte: Autora (2018).

A atividade fotossintética da *Chlorella* na amostra da entrada apresentou-se maior ao longo do período de exposição. Na Fase 2 não houve diferença estatística significativa (considerando um intervalo de confiança de 95%) em relação ao controle. Apesar do crescimento de células ter sido menor na Fase 3 (Figura 45-A), a alga não teve sua atividade fotossintética alterada (Figura 47-A).

Já para *Raphidocelis*, a atividade fotossintética na Fase 2 foi similar (considerando um intervalo de confiança de 95%) ao do controle (água deionizada). Nota-se também um aumento inicial da atividade na amostra de entrada e redução ao longo do tempo. A exposição da alga na amostra da Fase 3, além de reduzir a taxa de crescimento (Figura 45-B), possivelmente alterou significativamente o canal fotossintético da alga, reduzindo sua atividade (Figura 47-B).

De modo geral, observa-se que a resposta atividade fotossintética da *Raphidocelis* foi análoga à mobilidade da *Daphnia magna*, tal que não houve resposta positiva (estimulação) ou negativa (inibição) da amostra da Fase 2 e, com o aumento na concentração da amoxicilina

residual na Fase 3, a resposta negativa foi similar: baixa atividade fotossintética para *Raphidocelis* e total imobilidade para *Daphnias*. Vale lembrar que o efluente da Fase 3 também impactou significativamente na luminescência da bactéria *Vibrio fischeri*.

A partir dos resultados obtidos, é difícil afirmar que existe uma relação proporcional da concentração do antibiótico com a inibição do metabolismo das algas. Entretanto, Vasconcelos, Dalke e Oliveira (2017) conseguiram observar tal proporção para a atividade fotossintética da *Raphidocelis subcaptata*. Os pesquisadores avaliaram a inibição de quatro antibióticos entre 7,8 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e notaram um aumento na inibição de 4,8 a 80% para nitrofurantoína, 38 a 60% para trimetoprima, 46 a 80% para metronidazol e 74 a 100% para sulfametoxazol.

Lützhøft, Halling-sørensen e Jørgensen (1999) encontraram a concentração de amoxicilina que não se observa efeito no organismo da *Raphidocelis* (NOEC, do inglês “no observed effect concentration”): NOEC > 250  $\text{mg L}^{-1}$ . Eguchi *et al.* (2004) observaram que o EC<sub>50</sub> de ampicilina para *R. subcaptata* é >1000  $\text{mg L}^{-1}$ . Park e Choi (2008) afirmam que antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são de baixa toxicidade para organismos marinhos como *Vibrio fischeri* e *Daphnia magna* e Eguchi *et al.* (2004) verificaram que o EC<sub>50</sub> da ampicilina para *Chlorella vulgaris* é EC<sub>50</sub> > 1000  $\text{mg L}^{-1}$ . Isso pode justificar o resultado da cinética fotossintética da *Chlorella* frente à amostra da Fase 3: enquanto a *Raphidocelis* teve uma significativa redução, a *Chlorella* manteve-se próximo ao controle de água deionizada.

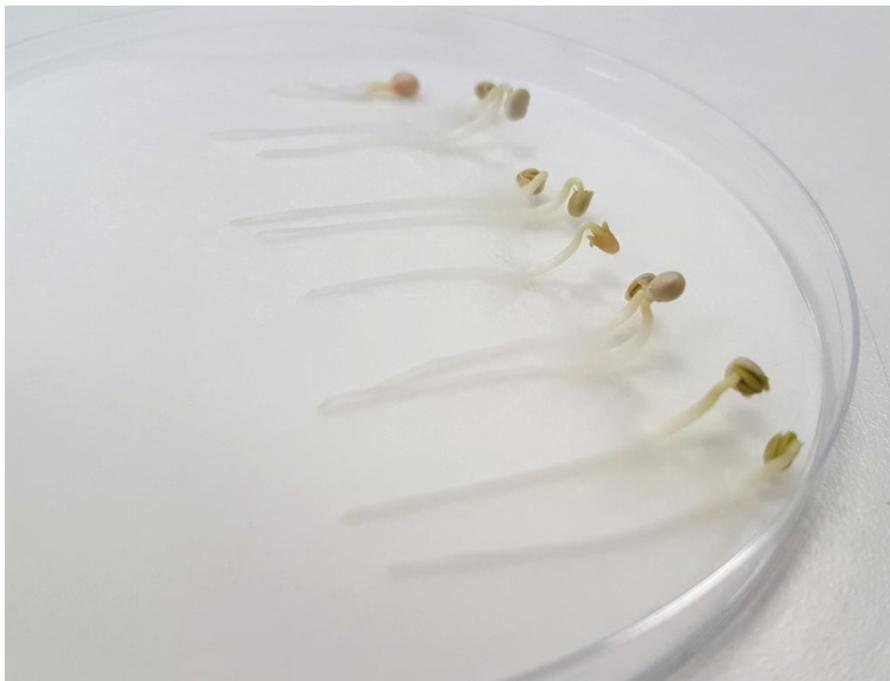
Outras algas também foram submetidas a testes para determinar a toxicidade da amoxicilina. Lützhøft, Halling-sørensen e Jørgensen (1999) determinaram o EC<sub>50</sub> de *Microcystis aeruginosa* (EC<sub>50</sub> = 0,0037  $\text{mg L}^{-1}$ ) e *Rhodomonas salina* (EC<sub>50</sub> = 3108  $\text{mg L}^{-1}$ ). Brain *et al.* (2004) quantificaram a concentração que leva a 10% da resposta máxima (EC<sub>10</sub>) para *Lemna gibba*: EC<sub>10</sub> > 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

A importância de avaliar a resposta das algas de toxicidade de um poluente está relacionada com o fato das algas estarem na base dos níveis tróficos, cujo efeito deletério pode refletir nos organismos mais complexos e desestruturar um ecossistema (PARK; CHOI, 2008).

#### **5.6.4. Sementes de alface (*Lactuca sativa*) e mostarda (*Sinapis alba*)**

A Figura 48 mostra uma imagem das sementes de mostarda (*Sinapis alba*) após o período de incubação em água deionizada.

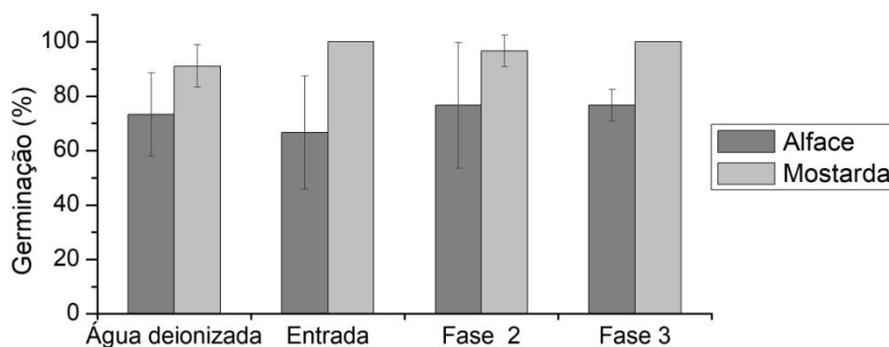
**Figura 48 - Foto das sementes de mostarda (*Sinapis alba*) germinada em água deionizada.**



Fonte: Autora (2018).

A Figura 49 apresenta a porcentagem das sementes que germinaram quando expostas às diferentes amostras.

**Figura 49 – Porcentagem de germinação de alface (*Lactuca sativa*) e mostarda (*Sinapis Alba*) em amostras do MBR (n = 30 sementes).**



Fonte: Autora (2018).

A análise estatística mostrou que não há diferença significativa nas porcentagens de germinações das sementes entre as matrizes de água deionizada, entrada e saída do MBR para alface ( $p > 0,05$ ), nem para mostarda ( $p > 0,05$ ). Aproximadamente 96% das sementes de mostarda germinaram, enquanto de alface esse valor foi em torno de 76%. O resultado deste experimento sugere que a composição do esgoto sintético bruto (entrada) e o residual presente nas saídas não tiveram efeitos tóxicos na germinação das sementes.

Pan e Chu (2016) também verificaram que não houve diferenças estatísticas significativas na germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa*), cenoura (*Daucus*

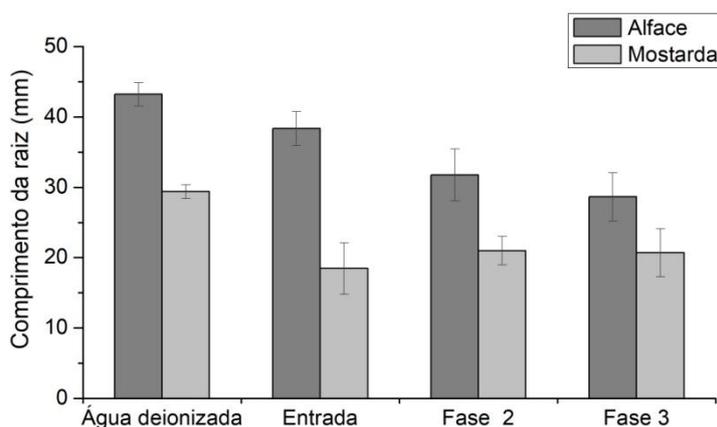
carota), pepino (*Cucumis sativus*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*) quando expostas a diferentes concentrações (0 a 300 mg L<sup>-1</sup>) dos antibióticos tetraciclina, sulfametazina, norfloxacina, eritromicina e cloranfenicol.

Aparentemente, o processo de germinação das sementes não é influenciado pela composição do meio, independente do tipo da semente e do poluente estudado. Isso também foi observado em testes de fitotoxicidade de paracetamol em trigo *Triticum aestivum* por An *et al.* (2009), de herbicida *Chlorimuron-ethyl*, cádmio e cobre atuando no trigo *Triticum aestivum* por Wang e Zhou (2005) e de compostos de lodo têxtil em sementes de soja e trigo por Araújo e Monteiro (2005).

A germinação das sementes depende da quantidade de reservas nutricionais armazenadas em seu interior e é um processo isolado do meio ambiente (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005). É provável que as camadas das sementes formem uma barreira do meio dificultando a penetração dos compostos químicos e sua absorção pelo embrião (PAN; CHU, 2016). Adicionalmente, caso ocorra adsorção dos poluentes nas sementes, não afetaria a germinação das raízes embrionárias (WANG; ZHOU, 2005).

A Figura 50 mostra o comprimento médio das raízes das sementes que germinaram em contato com cada amostra.

**Figura 50 – Comprimento da raiz das sementes germinadas em amostras do sistema MBR (n = 30 sementes).**



Fonte: Autora (2018).

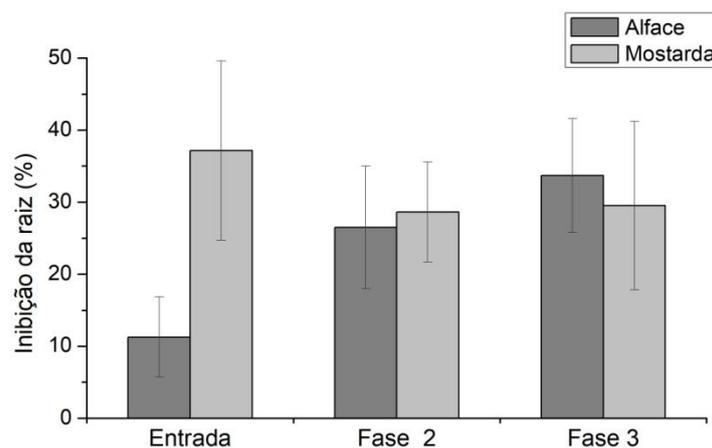
Pode-se observar que o esgoto sintético bruto (entrada) promoveu um crescimento maior para a semente de alface (*Lactuca sativa*) em relação ao efluente tratado (Fase 2 e Fase 3). Já para a semente de mostarda (*Sinapis alba*), a resposta de crescimento foi aparentemente menor para a amostra de entrada do que para os permeados, mas a análise por ANOVA indicou que não há diferença estatística entre o crescimento utilizando como matriz entrada e saídas ( $p > 0,05$ ).

O comprimento da raiz foi estatisticamente semelhante ( $p > 0,05$ ) para as amostras da Fase 2 e Fase 3 para ambas as sementes. Isso indica que a resposta de crescimento das duas plantas não apresentou diferença em relação à composição das amostras, ao contrário dos resultados dos testes com outros organismos avaliados, pois, neste caso, trata-se de organismos mais complexos que a bactéria luminescente, o pequeno crustáceo e as algas unicelulares.

De modo geral, no sistema controle (em água deionizada), o comprimento médio da raiz foi maior que nas demais amostras indicando que houve inibição do crescimento. Isso mostra que a composição da amostra de entrada e saídas impactaram negativamente no desenvolvimento das raízes. Essa inibição era esperada, pois, após a germinação, a raiz entra em contato direto com o meio podendo absorver os micropoluentes presentes e ter seu desenvolvimento afetado. Wang e Zhou (2005), Araújo e Monteiro (2005), An *et al.* (2009) e Pan e Chu (2016) além de observarem que a germinação das sementes não são afetadas pelo meio, também observaram que o crescimento das plantas é mais sensível que a germinação em relação às concentrações dos compostos.

Na Figura 51 pode-se observar a porcentagem de inibição do crescimento das plantas em relação ao sistema controle.

**Figura 51 – Porcentagem de inibição da raiz das sementes germinadas em amostras do sistema MBR: (A) *Lactuca sativa*; (B) *Sinapis alba* (n = 30 sementes).**



Fonte: Autora (2018).

Embora a inibição do afluente para a semente de mostarda aparente ser maior, a avaliação por ANOVA mostrou que as inibições de todas as matrizes foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ), indicando que as composições das amostras influenciaram no crescimento das raízes em um mesmo nível. Já para a semente de alface, as inibições das amostras de saída foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) e a entrada teve uma inibição menor (cerca de 11%).

Hillis *et al.* (2010) avaliaram a fitotoxicidade da amoxicilina em sementes de alface (*Lactuca sativa*), alfafa (*Medicago sativa*) e cenoura selvagem (*Daucus carota*) e verificaram que o valor de EC<sub>50</sub> para germinação e comprimento da raiz das três espécies é acima de 10000 mg L<sup>-1</sup>, indicando que o nível de toxicidade do antibiótico é baixo para esses cultivos.

Pan e Chu (2016) avaliaram a fitotoxicidade de cinco antibióticos em quatro cultivos-alvo: sementes de alface (*Lactuca sativa*), cenoura (*Daucus carota*), pepino (*Cucumis sativus*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*) e observaram que a alface foi considerada a mais sensível à maioria dos fármacos. Os valores concentração de efeito (EC<sub>50</sub>) na alface para cada antibiótico foi: tetraciclina = 14,4 mg L<sup>-1</sup>, sulfametazina = 157 mg L<sup>-1</sup>, norfloxacin = 49,4 mg L<sup>-1</sup>, eritromicina = 68,8 mg L<sup>-1</sup> e cloranfenicol = 204 mg L<sup>-1</sup> (PAN; CHU, 2016).

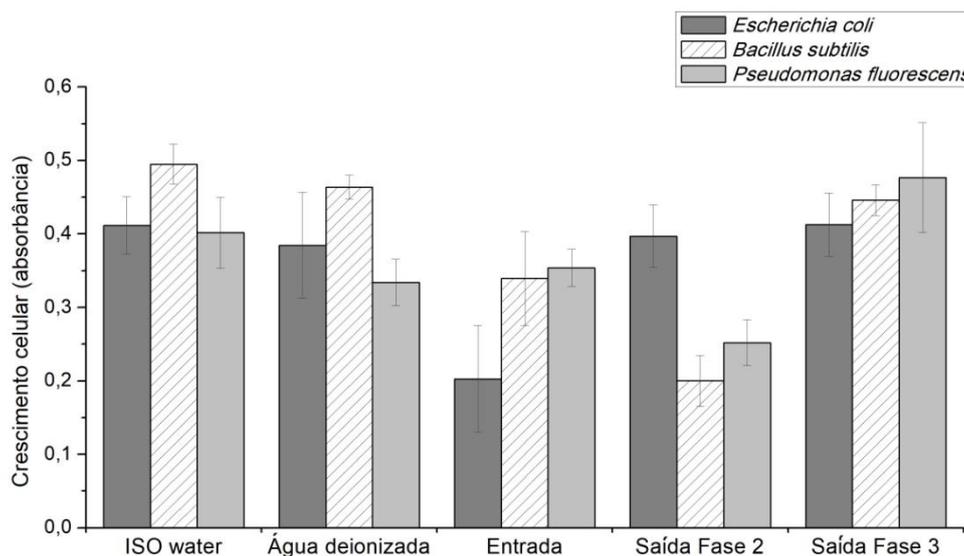
Embora as plantas não sejam alvo da ação dos antibióticos, a importância de se estudar a toxicidade nesses organismos está relacionada com sua capacidade de absorver, acumular e metabolizar os micropoluentes presentes no meio e, assim, afetar a cadeia trófica próxima (BARTONS; PEÑUELAS, 2017). Além disso, a avaliação da germinação das sementes e comprimento das raízes torna o ensaio de fitotoxicidade de amostras líquidas poluídas um método simples e barato para o biomonitoramento ambiental (SALVATORE; CARAFA; CARRATÙ, 2008).

#### **5.6.5. Bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*.**

A Figura 52 apresenta o crescimento celular das bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* em ISO water, água deionizada e amostras do MBR. Já a Figura 53 apresenta as porcentagens de inibição do crescimento celular, considerando como controle água deionizada.

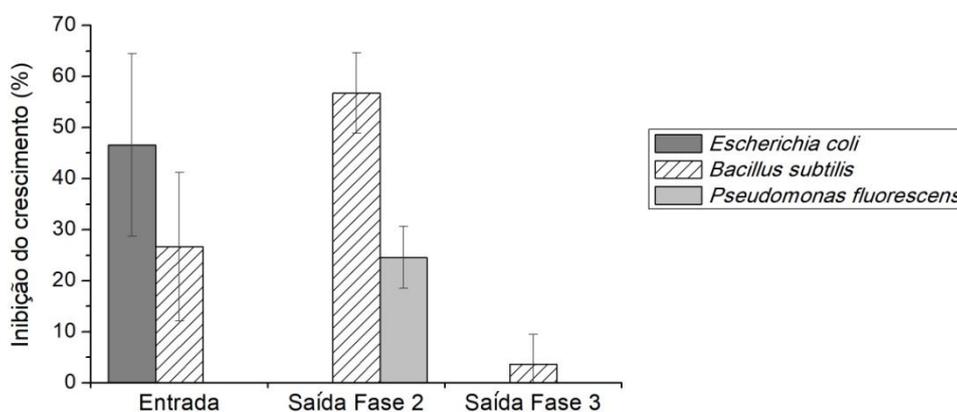
A solução de ISO water consiste em água deionizada acrescida de nutrientes a fim de avaliar o desenvolvimento dos microrganismos na presença ou ausência desses nutrientes. O gráfico de inibição aponta o não crescimento das bactérias nas amostras do MBR apenas em relação à água deionizada.

**Figura 52 – Crescimento celular das bactérias em ISO water, água deionizada, afluente (entrada) e efluente (saída) do sistema MBR (n = 6 replicatas).**



Fonte: Autora (2018).

**Figura 53 – Porcentagem de inibição do crescimento celular das bactérias em relação à água deionizada em amostras do sistema MBR (n = 6 replicatas).**



Fonte: Autora (2018).

Embora no gráfico da Figura 52 o crescimento celular das bactérias pareça similar em ambos os controles, a análise estatística indicou que o crescimento das três bactérias é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ). Ou seja, o crescimento é relativamente menor na ausência de nutrientes.

As concentrações do antibiótico no afluente e efluente podem ter modulado o crescimento da *E. coli*, pois esta é bastante sensível à atuação da amoxicilina. A inibição de crescimento de 47% nas amostras da entrada está relacionada à concentração teórica de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  do antibiótico. Já o maior crescimento nas amostras da saída pode indicar que os níveis residuais do fármaco não tenha afetado seu metabolismo, nem provocado inibição.

Testes realizados na década de 1980 evidenciaram a sensibilidade da *E. coli* em concentrações de apenas  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina (ROLINSON, 1980). Mas as pressões seletivas causadas pela exposição da bactéria aos compostos antibacterianos ao longo desse período fizeram prevalecer os indivíduos mais resistentes aos antibióticos, conforme demonstra Reinthaler *et al.* (2003), Kibret e Abera (2011) e Jiménez-belenguer *et al.* (2016). Dessa maneira, a não inibição do crescimento nas amostras de saída indica que a bactéria está resistente a concentrações da ordem de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fase 3).

*Bacillus subtilis* também teve seu crescimento inibido na presença de grande quantidade de amoxicilina da entrada, entretanto, tal inibição (27%) foi menor do que sofrida pela *E. coli* indicando que essa espécie apresenta certa resistência ao antibiótico, como mostra Luo e Helmann (2012), que avaliou a função extracitoplasmática de *B. subtilis* na resistência a vários antibióticos, dentre eles, a amoxicilina.

Já *Pseudomonas fluorescens* teve seu crescimento na entrada estatisticamente similar aos controles ( $p > 0,05$ ), que pode estar relacionado à resistência que esta bactéria tem à amoxicilina mesmo em concentrações de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . *P. fluorescens* foi considerada resistente à amoxicilina e à tetraciclina e de resistência intermediária à cefradina e norfloxacin em ensaios de antibiograma realizado por Zhou *et al.* (2015). Teste de antibiograma com disco-difusão consiste em avaliar o halo de inibição do crescimento bacteriano formado a partir da difusão de um antimicrobiano de um disco de papel-filtro saturado (SEJAS *et al.*, 2003).

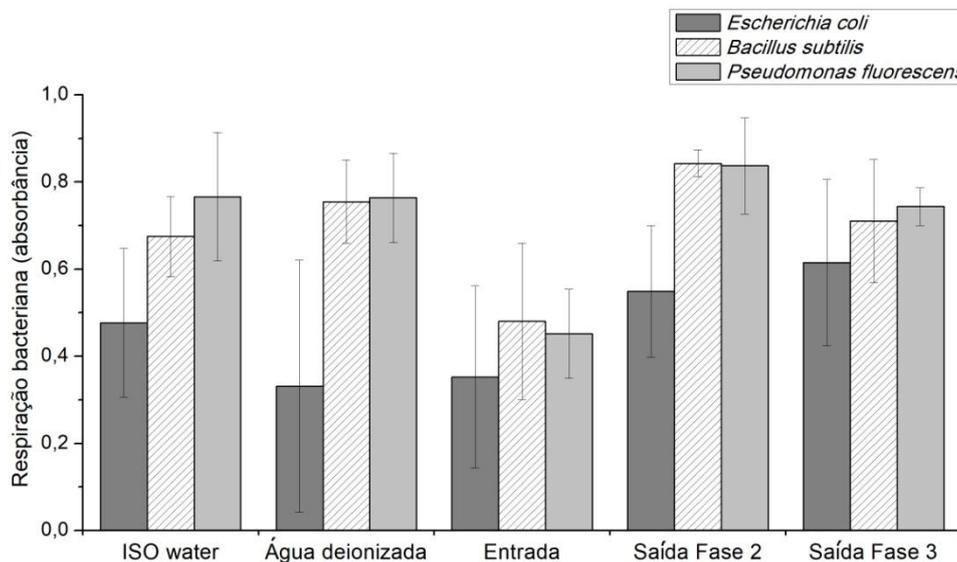
Já nas saídas, o comportamento de *B. subtilis* e *P. fluorescens* foi semelhante: baixo crescimento na amostra da Fase 2 e elevado na Fase 3. Esses resultados estão relacionados às condições favoráveis ou desfavoráveis ao seu crescimento, especialmente no que tange a disponibilidade de fonte de carbono. Conforme comprovado por Perotti *et al.* (2005) e Araújo, Aires e Farina (2006), a presença de matéria orgânica no meio favorece a sobrevivência e o crescimento das as bactérias *B. subtilis* e *P. fluorescens*.

Vale lembrar que o sistema MBR removeu altas porcentagens de remoção da maioria dos parâmetros químicos monitorados, assim, a qualidade do efluente coletado durante a Fase 2 condicionou as células bacterianas a entrarem no estado de letargia e de crescimento lento devido à baixa disponibilidade de nutrientes (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Com a alteração da vazão de trabalho, passou-se a detectar maiores níveis de amoxicilina e de carbono orgânico dissolvido (COD). Assim, a elevação da concentração de COD no efluente (de  $5,5$  a  $26,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) permitiu que as bactérias crescessem mais na Fase 3.

Embora *B. subtilis* tenha crescido na amostra da Fase 3, a Figura 53 aponta uma pequena inibição seu metabolismo (4%) em relação à água deionizada, possivelmente devido ao residual de amoxicilina (em torno de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

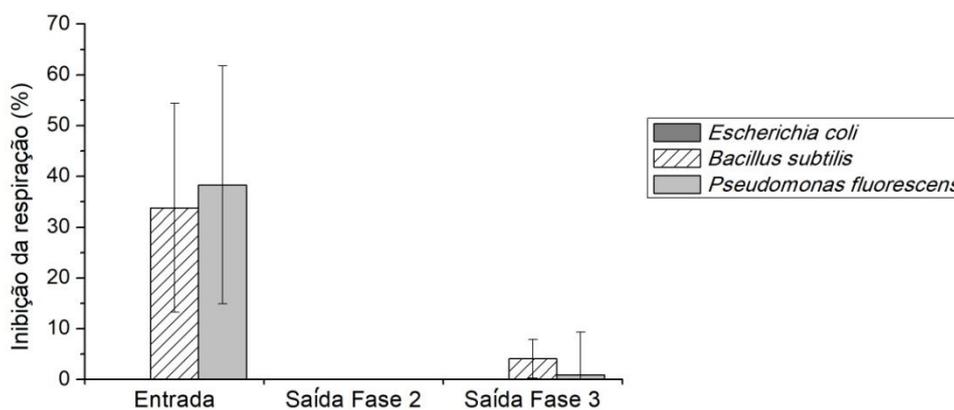
A Figura 54 apresenta a taxa de respiração das bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* após 42 horas expostas em *ISO water*, água deionizada e amostras do MBR. A Figura 55 mostra a porcentagem de inibição da respiração bacteriana nas amostras oriundas do MBR.

**Figura 54 – Respiração das bactérias em *ISO water*, água deionizada, afluente (entrada) e efluente (saída) do sistema MBR.**



Fonte: Autora (2018).

**Figura 55 – Porcentagem de inibição da respiração das bactérias em relação à água deionizada em amostras do sistema MBR.**



Fonte: Autora (2018).

Segundo o teste estatístico, não há variação significativa da respiração da *Escherichia coli* em *ISO water*, água deionizada e a amostra de entrada ( $p > 0,05$ ). É possível que a amoxicilina não tenha efeito na respiração bacteriana, uma vez que o crescimento na entrada (amox =  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi estatisticamente similar aos controles ( $p > 0,05$ ). O elevado nível de

respiração nas saídas da Fase 2 e 3 coincidem com o aumento no crescimento, indicando novamente que a bactéria é resistente aos níveis residuais de amoxicilina.

A respiração de *Pseudomonas fluorescens* foi inibida na amostra de entrada em 38%. Em contrapartida, nas Fases 2 e 3 os níveis de respiração foram tão elevados quanto nos controles de *ISO water* e água deionizada, tal que a ANOVA não apresentou diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ).

O comportamento da respiração de *Bacillus subtilis* foi quase análogo ao da *Pseudomonas*: inibição de respiração com o afluente e aumento dos níveis nas amostras de saída.

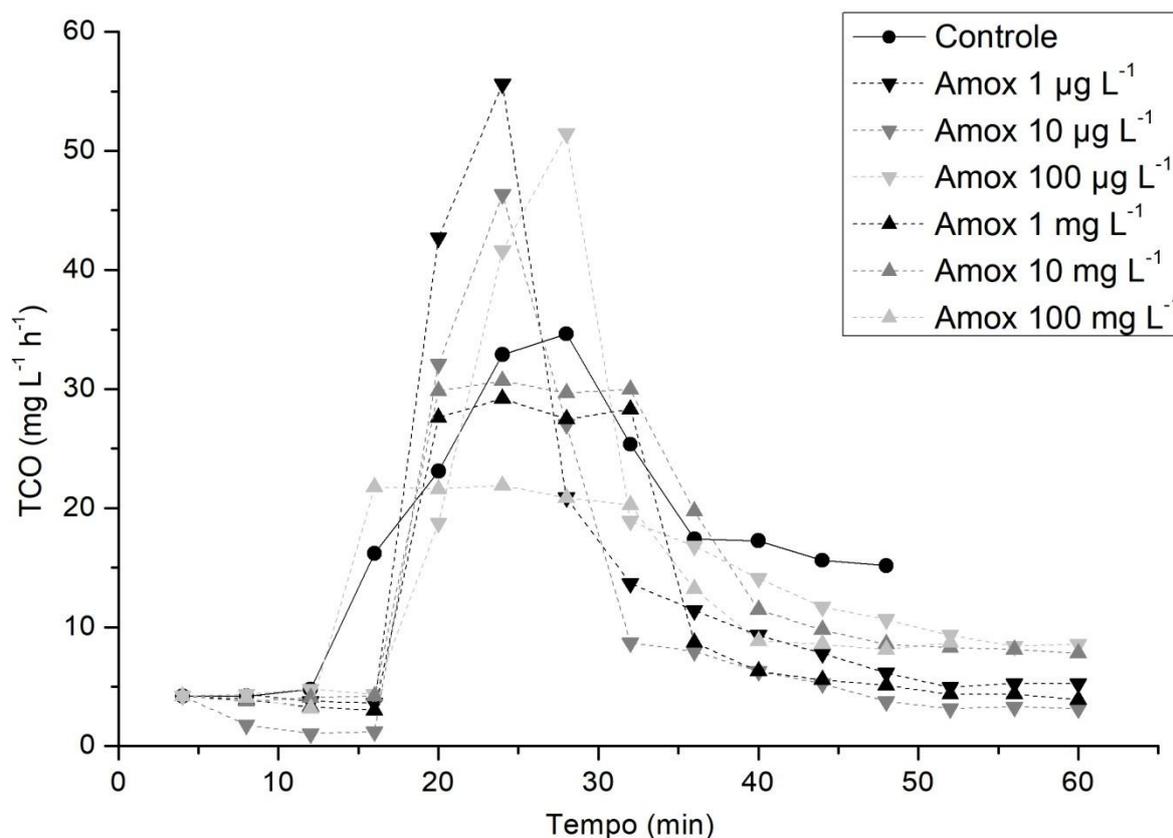
A resposta da respiração na Fase 2 para *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* reforça o argumento que, nesse cenário de ausência de fonte de carbono, as bactérias entraram em um estado de letargia, pois, embora o crescimento tenha sido reduzido, as bactérias não tiveram o nível de respiração alterado. Os resultados de respiração da última fase para *B. subtilis* e *P. fluorescens* coincide com os do crescimento. E para *B. subtilis* a respiração na Fase 3 também foi inibida em 4%.

De modo geral, os resultados de crescimento bacteriano e respiração celular apontam níveis de resistências diferentes para cada bactéria estudada. Ordenando por nível de resistência à amoxicilina, tem-se: *Pseudomonas fluorescens* > *Bacillus subtilis* > *Escherichia coli*. Ou seja, *P. fluorescens* é mais resistente e *E. coli* é menos resistente.

#### **5.6.6. Efeito da amoxicilina nas bactérias heterotrófica**

A cinética do comportamento das bactérias heterotróficas expostas a diferentes concentrações de amoxicilina ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $100 \text{mg L}^{-1}$ ) está apresentada nos respirogramas da Figura 56. Os respirogramas foram normalizados em relação à TCO endógena inicial do sistema controle, de forma que seja possível observar a variação da TCO máxima nos diferentes cenários.

Figura 56 – Respirograma das bactérias heterotróficas expostas a diferentes concentrações de amoxicilina.



Fonte: Autora (2018).

De modo geral, os respirogramas apresentaram dois comportamentos diferentes relacionados às concentrações aplicadas: ao adicionar 1, 10 e 100 µg L<sup>-1</sup> de amoxicilina, a taxa de respiração microbiana aumentou, elevando rapidamente a TCO e alcançando um único valor de TCO máxima (acima de 40 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) antes de retornar às condições endógenas. Já nos cenários com 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> de amoxicilina, a TCO também aumentou rapidamente, mas se manteve por um intervalo de tempo na TCO máxima e retornou à fase endógena gradualmente.

É importante destacar que as concentrações na faixa de µg L<sup>-1</sup> alcançaram um valor de TCO máxima superior ao do sistema controle, indicando que baixos níveis de amoxicilina não inibem a respiração bacteriana. Já a TCO máxima das concentrações na faixa de mg L<sup>-1</sup> foram inferiores ao controle e, de acordo com Lima *et al.* (2010), a redução da taxa máxima de consumo de oxigênio indica efeitos da toxicidade causada pelo composto químico na biomassa. Outro detalhe observado é que a maior concentração testada (100 mg L<sup>-1</sup>) apresentou o menor valor de TCO máxima (cerca de 22 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Além disso, nesta concentração, a TCO se manteve por mais tempo em seu valor máximo (20 minutos) do que nas outras concentrações (12 minutos, em média, nas concentrações de amoxicilina de 1 e 10

mg L<sup>-1</sup>). Isso pode ser explicado pela alteração das propriedades e da taxa de respiração do lodo devido à presença do micropoluente (BESHA, 2017).

Ricco *et al.* (2004) avaliaram a toxicidade de compostos xenobióticos (iclorofenol, formaldeído, nitrofenol e diclorometano) na biomassa de lodos ativados utilizando o método de respirometria e observou que, para todos os resultados, houve inibição dos microrganismos heterotróficos na presença desses compostos. Por outro lado, Basnyat (2008) utilizou o método da respirometria em biomassa de sistemas de lodos ativados e avaliou o efeito tóxico de 50 fármacos e apenas 11 foram considerados tóxicos com 50% de inibição em diferentes concentrações. Surerus, Giordano e Teixeira (2014) avaliaram a TCO de diferentes toxicantes em lodos de diferentes estações de tratamento de águas residuárias e observaram que mesmo as elevadas concentrações de amoxicilina testadas (4,5, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup>) não inibiram o crescimento microbiano provavelmente devido à alta seletividade de microrganismos presentes no lodo ativado.

O teste avaliou a respiração das bactérias heterotróficas aeróbias, por isso não é possível comparar com o processo de desnitrificação. O presente teste de respirometria com aeração intermitente e fornecimento de acetato de sódio como fonte de carbono caracteriza o processo de biodegradação de matéria orgânica pelas bactérias heterotróficas. O resultado do ensaio reforça que a concentração de 100 µg L<sup>-1</sup> de amoxicilina inserida no afluente do sistema não afetou a atuação das bactérias que biodegradavam a matéria orgânica aerobiamente, confirmando a eficiência de remoção de DQO acima de 94% em todas as fases.

#### **5.6.7. Visão geral dos efeitos ecotoxicológicos da amoxicilina**

A Tabela 20 apresenta um resumo das porcentagens de inibição (valores negativos) ou de estimulação (valores positivos) dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos das amostras de afluente e efluente do MBR contendo amoxicilina.

**Tabela 19 – Efeitos ecotoxicológicos da amoxicilina. Valores positivos indicam estimulação e valores negativos indicam inibição.**

<b>Organismo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Entrada</b>	<b>Fase 2</b>	<b>Fase 3</b>
Bactéria bioluminescente	<i>Vibrio fischeri</i>	+27,2%	-14,8%	-98,7%
Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	-35,0%	0%	-100%
Alga	<i>Chlorella vulgaris</i>	+286,5%	+14,9%	-78,9%
Alga	<i>Raphidocelis subcaptata</i>	+117,0%	+24,2%	-55,9%
Semente de alface	<i>Lactuca sativa</i>	-11,3%	-26,5%	-33,7%
Semente de mostarda	<i>Sinapis alba</i>	-37,2%	-28,6%	-29,5%
Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	-46,6%	0%	0%
Bactéria	<i>Bacillus subtilis</i>	-26,7%	-56,8%	-3,7%
Bactéria	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0%	-24,6%	+42,6%

Fonte: Autora (2018).

É válido lembrar que a composição do esgoto sintético bruto contém macro e micro nutrientes com vista à manutenção da biomassa do lodo inserido no MBR. Tais elementos podem servir de nutrientes aos organismos-alvo testados nos ensaios de ecotoxicidade, aumentando seu metabolismo e promovendo seu crescimento, reprodução, mobilidade, atividade fotossintética ou bioluminescência. Dessa forma, a presença desses elementos nas amostras do afluente do MBR e a redução dos mesmos nas amostras de saída interferiram no funcionamento biológico dos organismos-teste conjuntamente aos níveis de amoxicilina presentes em cada matriz.

De modo geral, a inibição dos organismos sensíveis ao antibiótico na amostra de entrada indicou que o efeito tóxico da concentração de amoxicilina presente ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) se sobrepôs aos efeitos positivos da composição do esgoto sintético em si. Em contrapartida, a concentração de amoxicilina não afetou o crescimento das algas, nem do *Vibrio fischeri*, mesmo sendo uma bactéria gram-negativa. Avalia-se que a quantidade de nutrientes presentes no afluente superestimulou as algas em mais de 100% comparando com o crescimento normal em um sistema controle, o que corrobora com os estudos sobre problemas de descarte inadequado de esgoto e crescimento acelerado das algas com a consequente eutrofização dos corpos d'água.

As baixas concentrações de amoxicilina nas amostras de saída da Fase 2 ( $28 \mu\text{g L}^{-1}$ ) pode ter permitido o funcionamento natural dos organismos-teste (ex.: *E. coli*), ao mesmo tempo em que o efluente mais limpo os tenha inibido à custa da redução das taxas de

nutrientes. É possível que essa redução de nutrientes disponíveis tenha predominado na inibição de *Vibrio fischeri*, algas, sementes e bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*.

Na Fase 3, por sua vez, o aumento da vazão de trabalho reduziu a porcentagens de remoção de alguns compostos elevando suas concentrações no permeado, dos quais: a amoxicilina (de 28 para 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), o carbono orgânico dissolvido (COD) (de 5,5 para 26  $\text{mg L}^{-1}$ ) e nitrogênio orgânico (de 2,9 para 6,6  $\text{mg L}^{-1}$ ). Com exceção desses três parâmetros, é possível considerar que a qualidade do efluente tratado foi similar nas Fases 2 e 3 de operação do MBR, ou seja, o efeito positivo dos nutrientes pode não mascarar o efeito negativo do antibiótico. Essa situação pode ser vista no aumento das taxas de inibição de *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, ambas as espécies de algas e sementes. Já o aumento de COD permitiu o crescimento das bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*. A pequena taxa de inibição de *B. subtilis* aponta a sensibilidade do organismo ao residual de amoxicilina presente no efluente tratado segundo as condições de operação da Fase 3 do MBR.

Os organismos que não apresentaram estimulação ou inibição (indicados por 0%) denotam que teve a resposta obtida do funcionamento de seu metabolismo foi equivalente aos dos organismos no sistema controle, não implicando em níveis de ecotoxicidade do composto ou da matriz da amostra.

#### **5.6.8. Efeitos ecotoxicológicos da amoxicilina em outros organismos**

Concentrações de amoxicilina e outros antibióticos no ecossistema aquático são consideradas tóxicas em diferentes níveis tróficos dependendo da sensibilidade dos organismos testados. Alguns pesquisadores realizaram testes ecotoxicológicos da amoxicilina e correlatos utilizando organismos-alvo diferentes aos do presente estudo:

Pascoe, Karntanut e Müller (2003) utilizaram cnidários da espécie *Hydra vulgaris* e observaram a contração dos pólipos e a velocidade das reações fisiológicas quando expostos por sete dias a amoxicilina (LOEC = 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Andreozzi *et al.* (2004) avaliaram a inibição do crescimento das cianobactérias unicelulares, *Synechococcus leopoliensis*, após 96 horas expostas a amoxicilina (NOEC = 0,78  $\mu\text{g L}^{-1}$  e LOEC = 1,56  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Soares *et al.* (2012) avaliaram a toxicidade crônica de *Danio rerio*, um peixe-zebra, exposto a ampicilina por oito meses (NOEC = 0,5  $\text{ng L}^{-1}$  e LOEC = 1,0  $\text{ng L}^{-1}$ ).

Ando *et al.* (2007) avaliaram o impacto da toxicidade de ampicilina no crescimento de seis espécies de cianobactérias: *Anabaena cylindrica* (EC<sub>50</sub> = 0,14  $\text{mg L}^{-1}$  e NOEC = 0,013  $\text{mg L}^{-1}$ ), *Anabaena flos-aquae* (EC<sub>50</sub> = 3,3  $\text{mg L}^{-1}$  e NOEC = 0,16  $\text{mg L}^{-1}$ ), *Anabaena variabilis* (EC<sub>50</sub> = 2,2  $\text{mg L}^{-1}$  e NOEC = 0,16  $\text{mg L}^{-1}$ ), *Microcystis aeruginosa* (EC<sub>50</sub> = 0,0002

mg L<sup>-1</sup> e LOEC = 0,000031 mg L<sup>-1</sup>), *Microcystis wesenbergii* (EC<sub>50</sub> = 0,013 mg L<sup>-1</sup> e LOEC = 0,002 mg L<sup>-1</sup>) e *Synechococcus leopoldensis* (EC<sub>50</sub> = 0,083 mg L<sup>-1</sup> e LOEC = 0,025 mg L<sup>-1</sup>).

Esses estudos mostram que os organismos mais complexos são mais resistentes à amoxicilina e a sensibilidade de algumas cianobactérias depende da espécie. Portanto, a presença de antibióticos, especialmente do tipo penicilínicos β-lactâmicos, no meio ambiente pode impactar alguns organismos e conseqüentemente, causar um desequilíbrio no ecossistema aquático e colocar em risco a saúde pública e segurança ambiental.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nos parâmetros monitorados, é possível concluir que o MBR funcionou satisfatoriamente, promovendo efluente de boa qualidade durante as três fases de operação. O reator operou sem apresentar necessidade de realizar a limpeza química na membrana durante as Fases 1 e 2, mas com o aumento da vazão na Fase 3 ocorreu a colmatação devido à concentração de sólidos e a velocidade que o material chega à superfície da membrana.

O valor de pH do licor misto manteve-se dentro da faixa considerada ótima recomendada (6 a 7) para o desempenho biológico de remoção de carbono orgânico total e nitrogênio total. O OD da zona anóxica manteve-se próximo à zero (0,1 mg L<sup>-1</sup>) durante toda a operação, e da zona aeróbia ficou entre 6,4 e 7,5 durante as Fases 1 e 2, mas teve grandes variações na Fase 3. Os valores médios de turbidez do permeado permaneceram abaixo de 1,0 UNT nas três fases, indicando que as membranas permaneceram íntegras durante todo o período operado.

A operação da Fase 1 na vazão de 1,0 L h<sup>-1</sup> e TDH = 40 h foi eficiente em remover DQO (94,3%) e COD (88,4%). A adição de 100 µg L<sup>-1</sup> de amoxicilina no afluente ao sistema durante a Fase 2 não influenciou no processo de remoção desses parâmetros, cujas eficiências foram mantidas para DQO (96,8%) e COD (84,2%). A mudança da vazão para 2 L h<sup>-1</sup> na Fase 3 também não alterou as remoções de DQO (94,3%), mas reduziu de COD (66,1%), cuja concentração média no permeado aumentou de 5,5 para 26,0 mg L<sup>-1</sup> da Fase 2 para Fase 3.

A nitrificação ocorreu de forma quase completa, haja vista a remoção elevada de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (> 98,7% em todas as fases) e predominância da fração N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no efluente, mesmo com a variação do OD na Fase 3. A análise estatística constatou que não há diferença significativa entre as porcentagens de remoção do nitrogênio amoniacal entre as três fases de operação, tal que a inserção da amoxicilina e alteração do TDH não interferiram no processo de remoção.

O controle dos parâmetros operacionais (OD próximo a zero e relação C/N = 20) tornou a recirculação o principal parâmetro que condiciona a ocorrência da desnitrificação. A recirculação - de 3x a vazão do permeado - é suficiente para suprir a quantidade de nitrato na câmara anóxica. Assim, verifica-se a ocorrência de desnitrificação dada a grande redução de nitrogênio total (>72% em todas as fases). A análise de variância apontou diferença significativa entre as Fases 1 e 2, sugerindo que a introdução da amoxicilina limitou a desnitrificação, tendo como consequência a detecção de nitrito na Fase 2. Já as Fases 2 e 3 são estatisticamente semelhantes, portanto, a alteração do TDH não influenciou na remoção de nitrogênio total.

A baixa porcentagem de remoção de fósforo total (15,6 e 17,3% nas Fases 1 e 2) é justificada pela configuração do reator, que não está apropriada para a remoção desse nutriente e sim, de nitrogênio. No entanto, o aumento da vazão na Fase 3 implicou na remoção de fósforo em 39,8%, provavelmente associada a maior assimilação.

Durante a Fase 2, a remoção de amoxicilina foi elevada alcançando 80% e a concentração residual no permeado foi, em média, de  $27,7 \mu\text{g L}^{-1}$ . O aumento da vazão para  $2 \text{ L h}^{-1}$  e a consequente redução do TDH para 20 h na Fase 3 reduziu a porcentagem de remoção do antibiótico para 54% e um aumento na concentração residual para  $48,1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

O ensaio para avaliar os mecanismos do MBR na remoção do fármaco apontou grande fração de amoxicilina (66%) adsorvida no lodo e disponível para biodegradação, sugerindo que o principal mecanismo de remoção da amoxicilina pelo MBR é a atuação da biomassa. O biofilme formado na superfície da membrana contribui com 3% na remoção do fármaco também pelo mecanismo de biodegradação ou adsorção. A hidrólise é o mecanismo que contribui menos (2%) para a remoção. A membrana não contribuiu para a retenção do fármaco, pois a massa molar de corte da membrana de ultrafiltração (100 kDa) é maior que a massa molar da amoxicilina.

Uma investigação analítica quantificou os seguintes produtos de degradação nas amostras de entrada do MBR: ácido penilóico amoxicilínico ( $0,22 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ), ácido penilóico amoxicilínico I ( $0,74 \pm 0,45 \mu\text{g L}^{-1}$ ), ácido penilóico amoxicilínico II ( $0,27 \pm 0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ ), amoxicilina diketo-piperazina-2,5-diona ( $0,46 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e pirazinona ( $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

As respostas dos organismos-alvo nos ensaios de ecotoxicidade mostraram o resultado dos efeitos positivos causados pelos nutrientes presentes no afluente e efluente e dos efeitos negativos das concentrações de amoxicilina, além de inferir sobre a importância do efeito de matriz na avaliação de ecotoxicidade.

O *Vibrio fischeri* não foi afetado pelas concentrações de amoxicilina nas amostras de entrada, mesmo sendo uma bactéria gram-negativa. Sua bioluminescência foi inibida em 14,8% na Fase 2 e em 98,7% na Fase 3. Já a *Daphnia magna* teve inibição da mobilização em 35% com as amostras do afluente. A amostra mais limpa do efluente da Fase 2 não inibiu os organismos, já na Fase 3, 100% das *Daphnias* foram imobilizadas devido ao aumento da concentração residual de amoxicilina.

As algas *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcaptata* foram superestimuladas (>100%) pela amostra de entrada, comparado com o crescimento esperado visto no sistema controle, devido à presença de micro e macro nutrientes utilizados no efluente sintético bruto. A redução substancial dos níveis desses nutrientes e a baixa concentração do antibiótico na Fase 2 permitiram um pequeno crescimento das algas *Chlorella* (em 14,9%) e *Raphidocelis* (em 24,2%). O aumento dos níveis de amoxicilina na Fase 3 inibiram o crescimento em 78,9% da *Chlorella* e em 55,9% da *Raphidocelis*.

A atividade fotossintética da *Chlorella vulgaris* na entrada e na Fase 2 foi, respectivamente, maior e estatisticamente igual ao sistema controle. Apesar do crescimento de células ter sido menor na Fase 3, sua capacidade de fotossíntese continuou próxima ao controle. Para *Raphidocelis subcaptata*, a atividade fotossintética na Fase 2 foi similar ao do controle, na entrada teve um aumento inicial e redução ao longo do tempo e na Fase 3 teve redução significativa.

A germinação das sementes não foi influenciada pela matriz das amostras a que estavam expostas. Comparado com o sistema controle, a semente de alface (*Lactuca sativa*) apresentou inibição no crescimento da raiz de 11,3, 26,5 e 33,7% e a semente de mostarda (*Sinapis alba*) de 37,2, 28,6 e 29,5%, respectivamente, para as amostras de entrada, saídas da Fase 2 e 3.

A *Escherichia coli* é sensível à amoxicilina, cujo crescimento celular foi inibido em 46,6% na amostra de entrada. A bactéria não apresentou inibição nem estimulação com as amostras das saídas, podendo indicar resistência a concentrações residuais na ordem de 50 µg L<sup>-1</sup> de amoxicilina.

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* é resistente à amoxicilina e, aparentemente, não foi impactada com a composição da amostra de entrada. A inibição do desenvolvimento celular de 24,6% com a amostra da Fase 2 está relacionada com a redução dos níveis de fonte de carbono (menor COD no efluente), uma vez que o aumento de COD na Fase 3 permitiu o crescimento dessas bactérias estatisticamente igual ao sistema controle.

*Bacillus subtilis* apresentou uma resistência intermediária em relação às outras duas bactérias. A porcentagem de inibição na entrada (26,7%) foi menor que da *E. coli*. O aumento

da inibição em 56,8% na Fase 2 soma os efeitos da ausência de nutrientes (no caso, de fonte de carbono) e das baixas concentrações de amoxicilina. Da mesma forma que *P. fluorescens*, o aumento de COD na Fase 3 permitiu o crescimento celular de *B. subtilis*, mas a inibição de 3,7% indica a sensibilidade aos níveis de amoxicilina residual.

O ensaio de respirometria mostrou que concentrações de 1 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de amoxicilina não inibem as bactérias heterotróficas aeróbias presentes na biomassa do MBR, e concentrações de 1 a 100  $\text{mg L}^{-1}$  as inibem.

Assim, avalia-se que em relação ao residual do antibiótico, o desempenho do sistema MBR nas condições operacionais da Fase 2 apresentou menores porcentagens de inibição nos metabolismos dos organismos-teste. Além disso, para elevar a eficiência de remoção da amoxicilina pelo sistema de MBR, uma possível alternativa seria combinar um pós-tratamento utilizando processos oxidativos avançados, adsorção em carvão ativado ou a utilização de membranas de nanofiltração ou de osmose reversa.

## 7. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES A FUTUROS TRABALHOS

Seria interessante avaliar o desempenho do MBR com variações de TRS, além do TDH. Poder-se-ia investigar a remoção conjunta de fósforo total e nitrogênio total realizando alterações das linhas de recirculação do lodo. Ademais, o tratamento com esgotos domésticos reais permitiria comparar com o funcionamento do MBR do presente estudo operado com afluente sintético.

Visando aumentar o conhecimento acerca dos mecanismos de remoção da amoxicilina ou de outros compostos emergentes, sugere-se avaliar a cinética de adsorção do contaminante na biomassa do sistema ou realizar ensaios de dessorção no lodo a fim de verificar a parcela efetivamente adsorvida e a biodegradada.

Em relação aos ensaios ecotoxicológicos, propõe-se determinar os níveis de NOEC, LOEC ou  $EC_{50}$  da amoxicilina em diferentes composições de matriz para comparar e compreender melhor os efeitos causados pelas amostras de entrada e saída do presente sistema. Ainda nessa linha, pode-se preparar uma água sintética que imita a qualidade de um rio limpo e comparar os efeitos ecotoxicológicos em diferentes matrizes.

Recomenda-se realizar o ensaio de respirometria para avaliar respostas respirométricas das bactérias autotróficas nitrificadoras e desnitrificadoras na presença de diferentes níveis de amoxicilina. Com isso, é possível comparar o efeito tóxico da amoxicilina em cada tipo de bactéria presente no lodo do MBR e avaliar possíveis impactos nos processos de nitrificação e desnitrificação do sistema.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 4TITUDE. *Round 96 Deep Well Storage Plates for use with Magnetic Separators*. Disponível em: <[www.4ti.co.uk/microplates/storage-plates/round-96-deepwell-magsep](http://www.4ti.co.uk/microplates/storage-plates/round-96-deepwell-magsep)>. Acesso em: 22 dez. 2017.
- ABBAS, Mazhar; ADIL, Muhammad; EHTISHAM-UL-HAQUE, Syed; MUNIR, Bushra; YAMEEN, Muhammad; GHAFFAR, Abdul; ABBASSHAR, Ghulam; TAHIR, M. Asif; IQBAL, Munawar. Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 626, p.1295-1309, jun. 2018.
- AHN, Young-ho. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 41, n. 8, p.1709-1721, ago. 2006.
- AN, Jing; ZHOU, Qixing; SUN, Fuhong; ZHANG, Lei. Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal Of Hazardous Materials*, [s.l.], v. 169, n. 1-3, p.751-757, set. 2009.
- ANDO, Tomonori; NAGASE, Hiroyasu; EGUCHI, Kaoru; HIROOKA, Takashi; NAKAMURA, Takanori; MIYAMOTO, Kazuhisa; HIRATA, Kazumasa. A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agents. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 26, n. 4, p.601-606, 2007.
- ANDREOTTOLA, Gianni; OLIVEIRA, Eduardo Luiz de; FOLADORI, Paola; DALLAGO, Loris; PETERLINI, Roberto; CADONNA, Maria. Método respirométrico para o monitoramento de processos biológicos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n. 1, p. 14-23, 2005.
- ANDREOZZI, Roberto; CAPRIO, Vincenzo; CINIGLIA, Claudia; CHAMPDORÉ, Marcella de; LOGIUDICE, Roberto; MAROTTA, Raffaele; ZUCCATO, Ettore. Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environmental Science & Technology*, [s.l.], v. 38, n. 24, p.6832-6838, dez. 2004.
- APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination for water and wastewater. 21 ed. Washington, DC: APHA-AWWA-WEF, 2016. v. 22. 1220 p.
- AQUINO, Sérgio Francisco de; BRANDT, Emanuel Manfred Freire; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da Literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Ouro Preto, v. 18, n. 3, p.187-204, jul. 2013.
- ARAÚJO, Ademir Sérgio Ferreira; MONTEIRO, Regina Teresa Rosim. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Scientia Agricola*, [s.l.], v. 62, n. 3, p.286-290, jun. 2005
- ARAÚJO, Fábio Fernando de; AIRES, Adriana Cristina Aparecida; FARINA, Fernanda Ribeiro. Lodo industrial como novo meio de cultura para *Bacillus subtilis*. *Colloquium Agrariae*, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-5, 24 out. 2006.

- AZAÏS, Antonin; MENDRET, Julie; PETIT, Eddy; BROSILLON, Stephan. Evidence of solute-solute interactions and cake enhanced concentration polarization during removal of pharmaceuticals from urban wastewater by nanofiltration. *Water Research*, [s.l.], v. 104, p.156-167, nov. 2016.
- BAGHAPOUR, Mohammad Ali; SHIRDARREH, Mohammad Reza; FARAMARZIAN, Mohammad. Amoxicillin removal from aqueous solutions using submerged biological aerated filter. *Desalination And Water Treatment*, [s.l.], v. 54, n. 3, p.790-801, 17 fev. 2014. Informa UK Limited.
- BAI, Y., CAI, T. J., CHEN, Z. B., WANG, H. C., HAN, W. Treatment of antibiotic wastewater containing amoxicillin by MBR and its mechanism. *Journal Of Harbin Institute Of Technology*, China, v. 44, n. 2, p.279-283, mar. 2012.
- BARBOSA, Marta O.; MOREIRA, Nuno F.F.; RIBEIRO, Ana R.; PEREIRA, M.F.R.; SILVA, A.M.T. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research*, [s.l.], v. 94, p.257-279, maio 2016.
- BARTRONS, Mireia; PEÑUELAS, Josep. Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Trends In Plant Science*, [s.l.], v. 22, n. 3, p.194-203, mar. 2017.
- BASNYAT, P. *Evaluation of Toxicity of Pharmaceuticals to the Activated Sludge Treatment Plant*. Master of science thesis. 2011. 72 p.
- BEAUSSE, Johanne. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends In Analytical Chemistr*, France, v. 23, p.753-761, 2004.
- BEEK, Tim Aus Der; WEBER, Frank-Andreas; BERGMANN, Axel; HICKMANN, Silke; EBERT, Ina; HEIN, Arne; KÜSTER, Anette. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 35, n. 4, p.823-835, 25 fev. 2016.
- BEHERA, Shishir Kumar; KIM, Hyeong Woo; OH, Jeong-eun; PARK, Hung-Suck. 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**, [s.l.], v. 409, n. 20, p.4351-4360, set. 2011.
- BENGTSSON-PALME, Johan; LARSSON, D. G. Joakim. Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nature Reviews: Microbiology*, Gothenburg, p.1-2, abr. 2015.
- BERTOLDI, Andréa Dâmaso; ARRAIS, Paulo Sergio Dourado; TAVARES, Noemia Urruth Leão; RAMOS, Luiz Roberto; LUIZA, Vera Lucia; MENGUE, Sotero Serrate; DAL-PIZZOL, Tatiane da Silva; FARIAS, Marení Rocha; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora. Utilização de medicamentos genéricos na população brasileira: uma avaliação da PNAUM 2014. *Rev Saúde Pública*. 2016.
- BESHA, Abreham Tesfaye; GEBREYOHANNES, Abaynesh Yihdego; TUFA, Ramato Ashu; BEKELE, Dawit Nega; CURCIO, Efrem; GIORNO, Lidietta. Removal of emerging micropollutants by activated sludge process and membrane bioreactors and the effects of

- micropollutants on membrane fouling: A review. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, [s.l.], v. 5, n. 3, p.2395-2414, jun. 2017.
- BEZERRA, Luiz Fernando. *Avaliação da remoção de matéria orgânica carbonácea e nitrogenada de águas residuárias utilizando biorreator de membranas*. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia, Faculdade de Engenharia - UNESP, Ilha Solteira, 2010.
- BEZERRA, Luiz Fernando; MATSUMOTO, Tsunao. Avaliação da remoção de matéria orgânica carbonácea e nitrogenada de águas residuárias em biorreator de membranas. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, [s.l.], v. 16, n. 3, p.253-260, set. 2011.
- BIRK, Sebastian; BONNE, Wendy; BORJA, Angel; BRUCET, Sandra; COURRAT, Anne; POIKANE, Sandra; SOLIMINI, Angelo; BUND, Wouter van de; ZAMPOUKAS, Nikolaos; HERING, Daniel. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, [s.l.], v. 18, p.31-41, jul. 2012.
- BOONNORAT, Jarungwit; TECHKARNJANARUK, Somkiet; HONDA, Ryo; PRACHANURAK, Pradthana. Effects of hydraulic retention time and carbon to nitrogen ratio on micro-pollutant biodegradation in membrane bioreactor for leachate treatment. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 219, p.53-63, nov. 2016.
- BOUND, J.p.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere*, [s.l.], v. 56, n. 11, p.1143-1155, set. 2004.
- BOXALL, Alistair B.a.; RUDD, Murray A.; BROOKS, Bryan W; CALDWELL, Daniel J.; CHOI, Kyungho; HICKMANN, Silke; INNES, Elizabeth; OSTAPYK, Kim; STAVELEY, Jane P; VERSLYCKE, Tim; ANKLEY, Gerald T.; BEAZLEY, Karen F.; BELANGER, Scott E.; BERNINGER, Jason P.; CARRIQUIRIBORDE, Pedro; COORS, Anja; DELEO, Paul C.; DYER, Scott D.; ERICSON, Jon F.; GAGNÉ, François; GIESY, John P.; GOUIN, Todd; HALLSTROM, Lars; KARLSSON, Maja V.; LARSSON, D. G. Joakim; LAZORCHAK, James M.; MASTROCCO, Frank; MCLAUGHLIN, Alison; MCMASTER, Mark E.; MEYERHOFF, Roger D.; MOORE, Roberta; PARROTT, Joanne L.; SNAPE, Jason R.; MURRAY-SMITH, Richard; SERVOS, Mark R.; SIBLEY, Paul K.; STRAUB, Jürg Oliver; SZABO, Nora D.; TOPP, Edward; TETREULT, Gerald R.; TRUDEAU, Vance L.; KRAAK, Glen van Der. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions?. *Environmental Health Perspectives*, [s.l.], v. 120, n. 9, p.1221-1229, 30 maio 2012.
- BRAIN, Richard A.; JOHNSON, David J.; RICHARDS, Sean M.; SANDERSON, Hans; SIBLEY, Paul K.; SOLOMON, Keith R. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 23, n. 2, p.371-382, 2004.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução N° 357, de 17 de março de 2005*. Brasília: MMA, 2005.

- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução N° 430, de 13 de maio de 2011*. Brasília: MMA, 2011.
- BRINDLE, K.; STEPHENSON, T. The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnology And Bioengineering*, [s.l.], v. 49, n. 6, p.601-610, 26 mar. 2000.
- BRITO, Natilene Mesquita; AMARANTE JUNIOR, Ozelito Possidônio de; POLESE, Luciana; RIBEIRO, Maria Lúcia. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão: *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13, 129-146, 2003.
- CABELLO, Felipe C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1137-1144, jul. 2006. Wiley-Blackwell.
- CADORE, I. R.; SILVA, M. K da; POLLO, L. D.; TESSARO, I. C. Biorreatores com membranas: Uma alternativa para o tratamento de efluentes. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014, Florianópolis. *Anais*. Florianópolis: COBEQ, 2014. p. 1 - 8.
- CALERO-DÍAZ, Gustavo; MONTEOLIVA-GARCÍA, Antonio; LEYVA-DÍAZ, Juan Carlos; LÓPEZ-LÓPEZ, Cristina; MARTÍN-PASCUAL, Jaime; TORRES, Juan Carlos; POYATOS, José Manuel. Impact of ciprofloxacin, carbamazepine and ibuprofen on a membrane bioreactor system: Kinetic study and biodegradation capacity. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, [s.l.], v. 92, n. 12, p.2944-2951, 7 jun. 2017.
- CAPODICCI, Marco; CORSINO, Santo Fabio; PIPPO, Francesca di; TRAPANI, Daniele Di; TORREGROSSA, Michele. An innovative respirometric method to assess the autotrophic active fraction: Application to an alternate oxic–anoxic MBR pilot plant. *Chemical Engineering Journal*, [s.l.], v. 300, p.367-375, set. 2016.
- CASTIGLIONI, Sara; BAGNATI, Renzo; FANELLI, Roberto; Pomati, Francesco; Calamari, Davide; Zuccato, Ettore. Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environmental Science & Technology*, [s.l.], v. 40, n. 1, p.357-363, jan. 2006.
- CATUNDA, S.Y.C.; DEEP, G.S.; VAN HAANDEL, A.C. Fast On-Line Measurement of the Respiration Rate in Activated Sludge Systems. *Technology Conference*, Belgium, 1996.
- CHAYID, Marwa A.; AHMED, Muthanna J. Amoxicillin adsorption on microwave prepared activated carbon from *Arundo donax* Linn: Isotherms, kinetics, and thermodynamics studies. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, [s.l.], v. 3, n. 3, p.1592-1601, set. 2015.
- CHEN, T.K.; NI, C.H.; CHEN, J.N.; LIN, J. High-strength nitrogen removal of opto-electronic industrial wastewater in membrane bioreactor – a pilot study. *Water Science and Technology*, v. 48, p. 1191-1198, 2003.
- CHRISTIAN, Thorsten; SCHNEIDER, Rudolf J.; FÄRBER, Harald A.; SKUTLAREK, Dirk; MEYER, Michael T.; GOLDBACH, Heiner E. Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, [s.l.], v. 31, n. 1, p.36-44, jul. 2003.

- CIZMAS, Leslie; SHARMA, Virender K.; GRAY, Cole M.; McDONALD, Thomas J. Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environmental Chemistry Letters*, [s.l.], v. 13, n. 4, p.381-394, 26 ago. 2015.
- CLARA, M.; STRENN, B.; GANS, O.; Martinez, E.; Kreuzinger, N.; Kroiss, H. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, [s.l.], v. 39, n. 19, p.4797-4807, nov. 2005.
- COSTA, Adriana Guimarães; FERREIRA, Andréa Fagundes; GUIMARÃES, Patrícia; CATUNDA, Sebastian Yuri Cavalcanti; HAANDEL, Adrianus Van. Respirimetria aplicada no sistema de lodo ativado: influência de interrupções da oxigenação sobre a viabilidade e atividade de lodo ativado. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 21ª Feira Internacional de Tecnologias de Saneamento Ambiental, 4. ABES*, 2001. p. 1-6.
- CUNNINGHAM, James H.; LIN, Lian-shin. Fate of Amoxicillin in Mixed-Culture Bioreactors and Its Effects on Microbial Growth and Resistance to Silver Ions. *Environmental Science & Technology*, [s.l.], v. 44, n. 5, p.1827-1832, mar. 2010.
- DAS, Sreejon; RAY, Nillohit Mitra; WAN, Jing; KHAN, Adnan; CHAKRABORTY, Tulip; RAY, Madhumita B. Micropollutants in Wastewater: Fate and Removal Processes. *Physico-chemical Wastewater Treatment And Resource Recovery*, [s.l.], p.75-105, 3 maio 2017.
- DEBLONDE, Tiphanie; COSSU-LEGUILLE, Carole; HARTEMANN, Philippe. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal Of Hygiene And Environmental Health*, [s.l.], v. 214, n. 6, p.442-448, nov. 2011.
- DESCHAMPS, Eleonora; VASCONCELOS, Olivia; LANGE, Lisete; DONNICI, Claudio Luis; SILVA, Mercedes Coelho da; SALES, Juliana Aparecida. Management of effluents and waste from pharmaceutical industry in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, [s.l.], v. 48, n. 4, p.727-736, dez. 2012.
- DU, Bowen; HADDAD, Samuel P.; SCOTT, W. Casan; Chambliss, Kevin; Brooks, Bryan W. Pharmaceutical bioaccumulation by periphyton and snails in an effluent-dependent stream during an extreme drought. *Chemosphere*, [s.l.], v. 119, p.927-934, jan. 2015.
- EBELE, Anekwe Jennifer; ABDALLAH, Mohamed Abou-elwafa; HARRAD, Stuart. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-16, mar. 2017.
- EGUCHI, Kaoru; NAGASE, Hiroyasu; OZAWA, Manao; ENDOH, Yuuko S.; GOTO, Kisako; HIRATA, Kazumasa; MIYAMOTO, Kazuhisa; YOSHIMURA, Haruo. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, [s.l.], v. 57, n. 11, p.1733-1738, dez. 2004.
- ELIZALDE-VELÁZQUEZ, Armando; GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel; GALAR-MARTÍNEZ, Marcela; ISLAS-FLORES, Hariz; DUBLÁN-GARCÍA, Octavio; SANJUAN-REYES, Nely.

- Amoxicillin in the Aquatic Environment, Its Fate and Environmental Risk. *Environmental Health Risk - Hazardous Factors To Living Species*, [s.l.], p.1-23, 16 jun. 2016. InTech.
- ELMOLLA, Emad S.; CHAUDHURI, Malay. The feasibility of using combined Fenton-SBR for antibiotic wastewater treatment. *Desalination*, [s.l.], v. 285, p.14-21, jan. 2012.
- EUROPEAN UNION. Constituição (2000). Directive nº 2000/60/EC, de 23 de outubro de 2000. *Directive 2000/60/EC Of The European Parliament And Of The Council*: establishing a framework for Community action in the field of water policy. European Parliament.
- EUROPEAN UNION. Constituição (2008). Directive nº 2008/105/EC, de 16 de dezembro de 2008. *Directive 2008/105/ec Of The European Parliament And Of The Council*: on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. European Parliament.
- EUROPEAN UNION. Constituição (2013). Directive nº 2013/39/EU, de 12 de agosto de 2013. *Directive 2013/39/eu Of The European Parliament And Of The Council*: amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. European Parliament.
- EUROPEAN UNION. Constituição (2015). Decision nº 2015/495, de 20 de março de 2015. *Commission Implementing Decision (eu) 2015/495*: establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. European Parliament.
- FABBRI, Elena; FRANZELLITTI, Silvia. Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 35, n. 4, p.799-812, 24 nov. 2015.
- FAN, Huiju; LI, Jing; ZHANG, Liqiu; FENG, Li. Contribution of sludge adsorption and biodegradation to the removal of five pharmaceuticals in a submerged membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, [s.l.], v. 88, p.101-107, jul. 2014.
- FELIX, Fabiana Ferreira; NAVICKIENE, Sandro; DÓREA, Haroldo Silveira. Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) como Indicadores da Qualidade dos Solos. *Revista da Fapesp*, v. 3, n. 2, p.39-62, jul. 2007.
- FERREIRA, Camila dos Santos; CUNHA-SANTINO, Marcela Bianchessi da; BIANCHINI JÚNIOR, Irineu. Eutrofização: aspectos conceituais, usos da água e diretrizes para a gestão ambiental. *Revista Ibero-americana de Ciências Ambientais*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.65-77, 9 abr. 2015.
- FLECK, Leandro; TAVARES, Maria Hermínia Ferreira; EYNG, Eduardo. Remoção biológica de nitrogênio em efluentes líquidos: Uma revisão. *Revista Eixo*, Brasília, v. 4, n. 2, p.77-88, jul. 2015.

- GAVRILESCU, Maria; DEMNEROVÁ, Kateřina; AAMAND, Jens; AGATHOS, Spiros; FAVA, Fabio. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, [s.l.], v. 32, n. 1, p.147-156, jan. 2015.
- GEBHARDT, Wilhelm; SCHRÖDER, Horst Fr. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *Journal Of Chromatography A*, [s.l.], v. 1160, n. 1-2, p.34-43, 2007
- GHAVA, Kiran; RATHOD, Mayuri C.; DHALE, D.A. Effect of antibiotics on seed germination and root elongation of wheat. *International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences*, [s.l.], v. 4, n. 1, p.516-527, jan. 2015.
- GHISELLI, Gislaine; JARDIM, Wilson F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p.695-706, jul. 2007.
- GÖBEL, Anke; MCARDELL, Christa S.; JOSS, Adriano; SIEGRIST, Hansruedi; GIGER, Walter. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 372, p.361-371, 2007.
- GODDARD, A.F; JESSA, M.J; BARRETT, D.A.; SHAW, P.N.; IDSTROM, J.P.; CEDERBERG, C.; SPILLER, R.C. Effect of omeprazole on the distribution of metronidazole, amoxicillin, and clarithromycin in human gastric juice. *Gastroenterology*, [s.l.], v. 111, n. 2, p.358-367, ago. 1996.
- GONZÁLEZ-PINZÓN, Ricardo; HAGGERTY, Roy; MYROLD, David D. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. *Journal Of Geophysical Research: Biogeosciences*, [s.l.], v. 117, n. 3, p.1-10, 19 jul. 2012.
- GOZLAN, Igal; ROTSTEIN, Adi; AVISAR, Dror. Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere*, [s.l.], v. 91, n. 7, p.985-992, maio 2013.
- GOZLAN, Igal; ROTSTEIN, Adi; AVISAR, Dror. Investigation of an amoxicillin oxidative degradation product formed under controlled environmental conditions. *Environmental Chemistry*, [s.l.], v. 7, n. 5, p.435-442, 2010
- GRANDCLÉMENT, Camille; SEYSSIECQ, Isabelle; PIRAM, Anne; WONG-WAH-CHUNG, Pascal; VANOT, Guillaume; TILIACOS, Nicolas; ROCHE, Nicolas; DOUMENQ, Pierre. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Research*, [s.l.], v. 111, p.297-317, mar. 2017.
- Guillén, Javier Adrián Sánchez. *Autotrophic Nitrogen Removal from Low Concentrated Effluents: Study of system configurations and operational features for pos-treatment of anaerobic effluents*. Leiden: Crc Press/balkema, 2016. 175 p.
- GUO, Jiahua; SINCLAIR, Chris J.; SELBY, Katherine; BOXALL, Alistair B.A. Toxicological and ecotoxicological risk-based prioritization of pharmaceuticals in the natural

- environment. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1550-1559, 22 jan. 2016.
- HAI, Faisal I.; TESSMER, Karin; NGUYEN, Luong N.; KANG, Jinguo; PRICE, William E.; NGHIEM, Long D. Removal of micropollutants by membrane bioreactor under temperature variation. *Journal Of Membrane Science*, [s.l.], v. 383, n. 1-2, p.144-151, nov. 2011.
- HELMER-MADHOK, C.; SCHMID, M.; FILIPOV, E.; GAUL, T.; HIPPEN, A.; ROSENWINKEL, K.H.; SEYFRIED, C.F.; WAGNER, M.; KUNST, S. Deammonification in biofilm systems: population structure and function. *Water Science and Technology*, v. 46, n. 1-2, p. 223-231, 2002
- HESPANHOL, Ivanildo. A inexorabilidade do reúso potável direto. *Revista DAE*, [s.l.], v. 63, n. 198, p.63-82, 2015. Editora Cubo Multimidia.
- HILLIS, Derek G.; FLETCHER, James; SOLOMON, Keith R.; Sibley, Paul K. Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, [s.l.], v. 60, n. 2, p.220-232, 24 Nov. 2010.
- HILTUNEN, Teppo; VIRTALA, Marko; LAINE, Anna-Liisa. Antibiotic resistance in the wild: an evolutionary perspective. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, [s.l.], v. 372, n. 1712, p.1-7, 5 dez. 2016.
- HUGHES, Diarmaid; ANDERSSON, Dan I. Evolutionary Trajectories to Antibiotic Resistance. *Annual Review Of Microbiology*, [s.l.], v. 71, n. 1, p.579-596, 8 set. 2017.
- IOELE, Giuseppina; LUCA, Michele de; RAGNO, Gaetano. Acute Toxicity of Antibiotics in Surface Waters by Bioluminescence Test. *Current Pharmaceutical Analysis*, Rende, v. 12, n. 3, p.220-226, jan. 2016.
- JIMÉNEZ-BELENQUER, Ana; DOMÉNECH, Eva; VILLAGRÁ, Arantxa; FENOLLAR, Alejandro; FERRÚS, Maria Antonia. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. *Avian Pathology*, [s.l.], v. 45, n. 4, p.501-507, 3 jul. 2016.
- JO, Sung Jun; KWON, Hyeokpil; JEONG, So-yeon; LEE, Chung-Hak; KIM, Tae Gwan. Comparison of microbial communities of activated sludge and membrane biofilm in 10 full-scale membrane bioreactors. *Water Research*, [s.l.], v. 101, p.214-225, set. 2016.
- JONES, Oliver A.; LESTER, John N.; VOULVOULIS, Nick. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends in Biotechnology*, London, v. 23, n. 4, p. 163-167, 2005.
- JONG, Jisun; LEE, Jaejin; KIM, Joonkyu; HYUN, Kyoungchak; HWANG, Taemun; PARK, Joonhong; CHOUNG, Younkyoo. The study of pathogenic microbial communities in graywater using membrane bioreactor. *Desalination*, [s.l.], v. 250, n. 2, p.568-572, jan. 2010.
- JOSS, Adriano; ZABCZYNSKI, Sebastian; GÖBEL, Anke; HOFFMANN, Burkhard; LÖFFLER, Dirk; MCARDELL, Christa S.; TERNES, Thomas A.; THOMSEN, Angela; SIEGRIST, Hansruedi. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*, [s.l.], v. 40, n. 8, p.1686-1696, maio 2006.

- JUDD, Simon. *The MBR Book: Principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment*. 2. ed. Oxford: BH, 2011.
- JUKOSKY, James A.; WATZIN, Mary C.; LEITER, James C. The effects of environmentally relevant mixtures of estrogens on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) reproduction. *Aquatic Toxicology*, [s.l.], v. 86, n. 2, p.323-331, jan. 2008.
- KAMIL, Ahmed M.; MOHAMMED, Halah T.; BALAKIT, Asim A.; HUSSEIN, Falah H.; BAHNEMANN, Detlef W.; EL-HITI, Gamal A. Synthesis, Characterization and Photocatalytic Activity of Carbon Nanotube/Titanium Dioxide Nanocomposites. *Arabian Journal For Science And Engineering*, [s.l.], v. 43, n. 1, p.199-210, 20 out. 2017.
- KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M.; GUWY, A.J. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, [s.l.], v. 1161, n. 1-2, p.132-145, ago. 2007.
- KIBRET, Mulugeta; ABERA, B. Antimicrobial susceptibility patterns of E. coli from clinical sources in northeast Ethiopia. *African Health Sciences*, Ethiopia, v. 11, n. 1, p.40-45, ago. 2011.
- KIM, Bokyung; JI, Kyunghye; KHO, Younglim; KIM, Pan-Gyi; PARK, Kyunghwa; KIM, Kyungtae; KIM, Youngsuk; KIM, Ki-Tae; CHOI, Kyungho. Effects of chronic exposure to cefadroxil and cefradine on *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*. *Chemosphere*, [s.l.], v. 185, p.844-851, out. 2017.
- KIM, M.; GUERRA, P.; SHAH, A.; PARSA, M.; ALAEE, M.; SMYTH, S.A. Removal of pharmaceuticals and personal care products in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. *Water Science & Technology*, [s.l.], v. 69, n. 11, p.2221-2229, jun. 2014.
- KIM, S; THIESSEN, P.A.; BOLTON, E.E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B.A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S.H. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*. 2016.
- KIMURA, Katsuki; HARA, Hiroe; WATANABE, Yoshimasa. Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactors (MBR). *Desalination*, [s.l.], v. 178, n. 1-3, p.135-140, jul. 2005. Elsevier BV.
- KLATTE, Stephanie; SCHAEFER, Hans-christian; HEMPEL, Maximilian. Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry And Pharmacy*, [s.l.], v. 5, p.61-66, jun. 2017.
- KNAPP, Charles W.; ENGEMANN, Christina A.; HANSON, Mark L.; HALL, Kenneth J.; GRAHAM, David W. Indirect Evidence of Transposon-Mediated Selection of Antibiotic Resistance Genes in Aquatic Systems at Low-Level Oxytetracycline Exposures. *Environmental Science & Technology*, [s.l.], v. 42, n. 14, p.5348-5353, jul. 2008.
- LABINGHISA, Ruby S.; ROLLON, Analiza P. Ampicillin Removal by Polyvinylidene Difluoride (PVDF), Polyethersulfone (PES) and Nylon for Membrane Bioreactor

- Application. *International Journal Of Innovation, Management And Technolog*, [s.l.], v. 5, n. 2, p.105-110, abr. 2014.
- LAFARRÉ, Marinel; PÉREZ, Sandra; KANTIANI, Lina; BARCELÓ, Damià. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 27, n. 11, p.991-1007, dez. 2008.
- LANNA FILHO, Roberto; FERRO, Henrique Monteiro; PINHO, Renata Silva Canuto de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, [s. L.], v. 4, n. 2, p.12-20, 06 jul. 2010.
- LAWS, Edward A. Toxicology. In: LAWS, Edward A. *Aquatic Pollution: An Introductory Text*. 4. ed. Los Angeles: Wiley, 2017. Cap. 8. p. 229-272.
- LE-CLECH, Pierre; CHEN, Vicki; FANE, Tony A.G. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal Of Membrane Science*, [s.l.], v. 284, n. 1-2, p.17-53, 2006.
- LEUNG, Ho Wing; JIN, Ling; WEI, Si; TSUI, Mirabelle Mei Po; ZHOU, Bingsheng; JIAO, Liping; CHEUNG, Pak Chuen; CHUN, Yiu Kan; MURPHY, Margaret Burkhardt; LAM, Paul Kwan Sing. Pharmaceuticals in Tap Water: Human Health Risk Assessment and Proposed Monitoring Framework in China. *Environmental Health Perspectives*, [s.l.], v. 121, n. 7, p.839-846, 10 maio 2013.
- LIMA, E. P. C et al. Respirometria aplicada ao tratamento biológico de efluentes com poluentes inibidores da nitrificação. I Congresso Baiano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Salvador: Cobasi, 2010. 4p.
- LOCATELLI, Marco Antonio F.; SODRÉ, Fernando F.; JARDIM, Wilson F. Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, [s.l.], v. 60, n. 3, p.385-393, 10 jun. 2010.
- LUO, Yun; HELMANN, John D. Analysis of the role of *Bacillus subtilis*  $\sigma^M$  in  $\beta$ -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Molecular Microbiology*, [s.l.], v. 83, n. 3, p.623-639, 4 jan. 2012.
- LUO, Yunlong; GUO, Wenshan; NGO, Huu Hao; NGHIEM, Long Duc; HAI, Faisal Ibney; ZHANG, Jian; LIANG, Shuang; WANG, Xiaochang C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 473-474, p.619-641, mar. 2014.
- LÜTZHØFT, H.-c. Holten; HALLING-SØRENSEN, B.; JØRGENSEN, S. E. Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, [s.l.], v. 36, n. 1, p.1-6, 1 Jan. 1999.
- MACFARLANE, Duncan J. Open-circuit respirometry: a historical review of portable gas analysis systems. *European Journal Of Applied Physiology*, [s.l.], v. 117, n. 12, p.2369-2386, 17 out. 2017.

- MAGALHAES, Danielly de Paiva; FERRAO-FILHO, Aloysio. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p.1-27, jan. 2008.
- MAILLER, R.; GASPERI, J.; COQUET, Y.; BULETÉ, A.; VULLIETC, E.; DESHAYES, S.; ZEDEK, S.; MIRANDE-BRET, C.; EUDES, V.; BRESSY, A.; CAUPOS, E.; MOILLERON, R.; CHEBBO, G.; ROCHERF, V. Removal of a wide range of emerging pollutants from wastewater treatment plant discharges by micro-grain activated carbon in fluidized bed as tertiary treatment at large pilot scale. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 542, p.983-996, jan. 2016.
- MAKIN, Simon. Fish flourish on anxiety drug. *Nature*, [s.l.], 8 ago. 2014.
- MANSOURI, Hayet; CARMONA, Rocio J.; GOMIS-BERENGUER, Alicia; SOUISSI-NAJAR, Souad; OUEDERNI, Abdelmottaleb; ANIA, Conchi O. Competitive adsorption of ibuprofen and amoxicillin mixtures from aqueous solution on activated carbons. *Journal of Colloid and Interface Science*, [s.l.], v. 449, p.252-260, jul. 2015.
- MARCELINO, R. B. P.; ANDRADE, L. N.; STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; BARBOSA, M. L. T.; LOPES, R. P.; REIS, B. G., LEÃO, M. M. D. Evaluation of aerobic and anaerobic biodegradability and toxicity assessment of real pharmaceutical wastewater from industrial production of antibiotics. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, [s.l.], v. 33, n. 3, p.445-452, set. 2016.
- MATSUO, H.; SAKAMOTO, H.; ARIZONO, K.; SHINOHARA, R. Behavior of Pharmaceuticals in Waste Water Treatment Plant in Japan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, [s.l.], v. 87, n. 1, p.31-35, 12 maio 2011.
- MAZZONETTO, Caroline. Sabesp e Sanasa adotam MBR para tratar efluente industrial. 2012. Disponível em: <[infraestruturaurbana.pini.com.br/solucoes-tecnicas/19/mbr-inov.aspx](http://infraestruturaurbana.pini.com.br/solucoes-tecnicas/19/mbr-inov.aspx)>. Acesso em: 27 ago. 2016.
- MELIN, T.; JEFFERSON, B.; BIXIO, D.; THOEYE, C.; DE WILDE, W.; DE KONING, J.; VAN DER GRAAF, J.; WINTGENS, T. Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination*, [s.l.], v. 187, n. 1-3, p.271-282, fev. 2006.
- MENG, Q.; YANG, F.; LIU, L.; MENG, F. Effects of COD/N ratio and DO concentration on simultaneous nitrification and denitrification in an airlift internal circulation membrane bioreactor. *Journal of Environmental Sciences*, China, v. 20, n. 8, p. 933-939, 2008
- MENGUE, Sotero Serrate; BERTOLDI, Andréa Dâmaso; BOING, Alexandra Crispim; TAVARES, Noemia Urruth Leão; PIZZOL, Tatiane da Silva Dal; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora; ARRAIS, Paulo Sérgio Dourado; RAMOS, Luiz Roberto; FARIAS, Marení Rocha; LUIZA, Vera Lucia; BERNA, Regina Tomie Ivata; BARROS, Aluísio Jardim Dornellas de. Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos (PNAUM): métodos do inquérito domiciliar. *Rev Saude Publica*. 2016.

- METCALF, Leonard; EDDY, Harrison P. *Tratamento de Efluentes e Recuperação de Recursos*. 5. ed.[s.l.]: Mcgraw Hill, 2016. 2016 p.
- MICHAEL, I.; RIZZO, L.; McARDELL, C.S.; MANAIA, C.M.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; Dagot, C.; FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, [s.l.], v. 47, n. 3, p.957-995, mar. 2013.
- MICHELAN, R. *Influência do tipo de impelidor sobre o desempenho do reator anaeróbio em batelada sequencial com biomassa granulada tratando esgoto sintético*. 2006. 211 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- MINH, Tu Binh; LEUNG, Ho Wing; LOI, I. Ha; CHAN, Wing Hei; SO, Man Ka; MAO, J.Q.; CHOI, David; LAM, James C.W.; ZHENG, Gene; MARTIN, Michael; LEE, Joseph H.W.; LAM, Paul K.S.; RICHARDSON, Bruce J. Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 58, n. 7, p.1052-1062, jul. 2009.
- MONCLÚS, Hector; SIPMA, Jan; FERRERO, Giuliana; RODRIGUEZ-RODA, Ignasi; COMAS, Joaquim. Biological nutrient removal in an MBR treating municipal wastewater with special focus on biological phosphorus removal. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 101, n. 11, p.3984-3991, jun. 2010.
- MORSE, Audra; JACKSON, Andrew. *Fate of a representative pharmaceutical in the environment*. Texas: Texas Water Resources Institute, 2003. 47 p.
- NÄGELE, Edgar; MORITZ, Ralf. Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MSn and accurate mass determination by ESI TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, [s.l.], v. 16, n. 10, p.1670-1676, out. 2005.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). *Water Reuse: Potential for Expanding the Nation's Water Supply through Reuse of Municipal Wastewater*. Washington, D.c: The National Academies Press, 2012.
- NATURE, E. The antibiotic alarm. *Nature*, [s.l.], v. 495, n. 7440, p.141-141, 12 mar. 2013.
- NG, Aileen N.I.; KIM, Albert S. A mini-review of modeling studies on membrane bioreactor (MBR) treatment for municipal wastewaters. *Desalination*, [s.l.], v. 212, n. 1-3, p.261-281, jun. 2007.
- NGUYEN, Thanh-Tin; BUI, Xuan-Thanh; LUU, Vinh-Phuc; NGUYEN, Phuoc-Dan; GUO, Wenshan; NGO, Huu-Hao. Removal of antibiotics in sponge membrane bioreactors treating hospital wastewater: Comparison between hollow fiber and flat sheet membrane systems. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 240, p.42-49, set. 2017.
- OECD. Test No. 202: *Daphnia magna* Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. 2004.

- OECD. Test No. 201: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. 2002.
- PAL, Amrita; GIN, Karina Yew-hoong; LIN, Angela Yu-chen; REINHARD, Martin. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 408, n. 24, p.6062-6069, nov. 2010.
- PALMA, P.; LEDO, L.; ALVARENGA, P. Ecotoxicological endpoints, are they useful tools to support ecological status assessment in strongly modified water bodies? *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 541, p.119-129, jan. 2016.
- PAN, Min; CHU, L.M. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [s.l.], v. 126, p.228-237, abr. 2016.
- PARK, Sujung; CHOI, Kyungho. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, [s.l.], v. 17, n. 6, p.526-538, 1 maio 2008.
- PARVEZ, Shahid; VENKATARAMAN, Chandra; MUKHERJI, Suparna. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, [s.l.], v. 32, n. 2, p.265-268, fev. 2006.
- PASCOE, David; KARNTANUT, Wanchamai; MÜLLER, Carsten T. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, [s.l.], v. 51, n. 6, p.521-528, maio 2003.
- PAVLOVIĆ, Dragana Mutavdžić; BABIĆ, Sandra; HORVAT, Alka J.M.; KAŠTELAN-MACAN, Marija. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 26, n. 11, p.1062-1075, dez. 2007.
- PÉREZ-PARADA, Andrés; AGÜERA, Ana; GÓMEZ-RAMOS, María del Mar; GARCÍA-REYES, Juan F.; HEINZEN, Horacio; FERNÁNDEZ-ALBA, Amadeo R. Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, [s.l.], v. 25, n. 6, p.731-742, 15 fev. 2011.
- PEROTTI, E.B.R.; MENENDEZ, L.T.; GAIA, O.E.; PIDELLO, A. Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con diferente contenido de materia orgánica. *Revista Argentina de Microbiología*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 37, n. 2, p.102-105, abr. 2005.
- PIKKEMAAT, M.G., YASSIN, H., VAN DER FELLS-KLERX, H. J.; BERENDSEN, B.J.A. *Antibiotic Residues and Resistance in the Environment*. Wageningen, RIKILT Wageningen UR (University & Research centre), RIKILT report 2016. 009. 32 pp.
- PINHO, Eliane Alves da Silva; FERREIRA, Luiz Fernando Romanholo; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê; TORRES, Nádia Hortense. Tratamento de esgoto sanitário contendo micropoluentes no Brasil: Revisão. *Bioenergia em Revista: Diálogos*, Piracicaba, v. 7, n. 2, p.43-63, jul. 2017.

- PRASERTKULSAK, S.; CHIEMCHAISRI, C.; CHIEMCHAISRI, W.; ITONAGA, T.; YAMAMOTO, K. Removals of pharmaceutical compounds from hospital wastewater in membrane bioreactor operated under short hydraulic retention time. *Chemosphere*, [s.l.], v. 150, p.624-631, maio 2016.
- PUBCHEM. *Amoxicillin*: 2D Structure. New Orleans. 2005. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amoxicillin>. Acesso em: 25 nov. 2016.
- PUTRA, Eric Kristia; PRANOWO, Ramon; SUNARSO, Jaka; INDRASWATI, Nani; ISMADJI, Suryadi. Performance of activated carbon and bentonite for adsorption of amoxicillin from wastewater: Mechanisms, isotherms and kinetics. *Water Research*, [s.l.], v. 43, n. 9, p.2419-2430, maio 2009.
- RADJENOVIĆ, J.; JELIĆ, A.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [s.l.], v. 393, n. 6-7, p.1685-1695, 27 jan. 2009.
- REINTHALER, F.f; POSCH, J; FEIERL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, [s.l.], v. 37, n. 8, p.1685-1690, abr. 2003.
- REYNS, T.; CHERLET, M.; BAERE, S.; BACKER, P.; CROUBLES, S. Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues. *J. Chromatogr. B.*, v.861, p.108-116, 2008.
- RICCO, Giuseppina; TOMEI, M.concetta; RAMADORI, Roberto; LAERA, Giuseppe. Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox®. *Water Research*, [s.l.], v. 38, n. 8, p.2103-2110, abr. 2004.
- RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Leticia; GONZÁLEZ-VIAR, Marta; FLORIO, Loredana de; TEJERO, Iñaki. Hybrid membrane bioreactor application for decentralized treatment and reuse. *Desalination and Water Treatment*, [s.l.], v. 51, n. 10-12, p.2467-2473, fev. 2013.
- ROLINSON, G. N. Effect of  $\beta$ -Lactam Antibiotics on Bacterial Cell Growth Rate. *Microbiology*, [s.l.], v. 120, n. 2, p.317-323, 1 out. 1980.
- RUBIM, Cristiane. Membranas de ultrafiltração e MBR são soluções tecnológicas para o tratamento de efluentes. *Revista TAE*, Santo André, v. 1, n. 23, fev. 2015.
- RUBY, E. G.; URBANOWSKI, M.; CAMPBELL, J.; DUNN, A.; FAINI, M.; GUNSALUS, R.; LOSTROH, P.; LUPP, C.; McCANN, J.; MILLIKAN, D.; SCHAEFER, A.; STABB, E.; STEVENS, A.; VISICK, K.; WHISTLER, C.; GREENBERG, E. P. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 102, n. 8, p.3004-3009, 9 fev. 2005.

- SALVATORE, M. di; CARAFA, A.M.; CARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, [s.l.], v. 73, n. 9, p.1461-1464, nov. 2008.
- SANT'ANNA JUNIOR, G. L.; CERQUEIRA, A. C. Biorreatores com Membranas. In: DEZOTTI, M.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L.; BASSIN, J. P. *Processos Biológicos Avançados para Tratamento de Efluentes e Técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana*. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. Cap. 2. p. 9-41.
- SECONDES, Mona Freda N.; NADDEO, Vincenzo; BELGIORNO, Vincenzo; BALLESTEROS JR., Florencio. Removal of emerging contaminants by simultaneous application of membrane ultrafiltration, activated carbon adsorption, and ultrasound irradiation. *Journal Of Hazardous Materials*, [s.l.], v. 264, p.342-349, jan. 2014.
- SEJAS, Lilian M.; SILBERT, Suzane; REIS, Adriana O.; SADER, Hélio S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p.27-35, jan. 2003.
- SILVA FILHO, Heraldo Antunes; BARROS, Antônio Ricardo Mendes; SANTOS, Elivânia Vasconcelos Moraes dos; SOUZA, José Tavares de; VAN HAANDEL, Adrianus Cornelios. Seleção de substratos padrões para ensaios respirométricos aeróbios com biomassa de sistemas de lodo ativado. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, 2015.
- SILVA, Joel Rocha; VARGEM, Daiana da Silva; SANTOS, Willians dos; FURTOSO, Graziela Ferreira; NASCIMENTO, Eliane de Fátima Vieira; MENEZES, Eliana Divina de. Inativação por hidrólise alcalina de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, cefalosporínicos e penicilâmicos. **Ensaio e Ciência**: Ciências biológicas, agrárias e da saúde, Anápolis, v. 17, n. 1, p.19-31, jan. 2013.
- SILVA, Josielma Santos; ROCHA, Iolanda Karoline Barros dos Santos; FREITA, Lucenilde Carvalho de; PEREIRA, Natália Jovita; CARVALHO NETA, Raimunda Nonata Fortes. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. *Revista Bioética*, [s.l.], v. 23, n. 2, p.409-418, ago. 2015.
- SINGH, Vineet; PANDEY, Bhawna; SUTHAR, Surindra. Phytotoxicity of amoxicillin to the duckweed *Spirodela polyrhiza*: Growth, oxidative stress, biochemical traits and antibiotic degradation. *Chemosphere*, [s.l.], v. 201, p.492-502, jun. 2018.
- SIPMA, Jan; OSUNA, Begoña; COLLADO, Neus; MONCLÚS, Hector; FERRERO, Giuliana; COMAS, Joaquim; RODRIGUEZ-RODA, Ignasi. Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. *Desalination*, [s.l.], v. 250, n. 2, p.653-659, jan. 2010.
- SMITH, C. V.; DIGREGORIO, D.; TALCOTT, R. M. The use of ultrafiltration membranes for activated sludge separation, in: Proceedings of the 24th Annual Purdue Industrial Waste Conference, 1969, Apud: LE-CLECH, Pierre; CHEN, Vicki; FANE, Tony A.G. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal Of Membrane Science*, [s.l.], v. 284, n. 1-2, p.17-53, 2006.

- SOARES, J.; CASTRO, L. Filipe C.; REIS-HENRIQUES, M. A.; MONTEIRO, N. M.; SANTOS, M. M. Zebrafish (*Danio rerio*) life-cycle exposure to chronic low doses of ethinylestradiol modulates p53 gene transcription within the gonads, but not NER pathways. *Ecotoxicology*, [s.l.], v. 21, n. 5, p.1513-1522, 28 abr. 2012.
- SOPAJ, Flamur; RODRIGO, Manuel A.; OTURAN, Nihal; PODVORICA, Fetah I.; PINSON, Jean; OTURAN, Mehmet A. Influence of the anode materials on the electrochemical oxidation efficiency. Application to oxidative degradation of the pharmaceutical amoxicillin. *Chemical Engineering Journal*, [s.l.], v. 262, p.286-294, fev. 2015.
- SOUZA, T S O. *Desnitrificação autotrófica usando sulfeto como doador de elétrons para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgotos sanitários*. 2011. 167 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- SPANJERS, Henri. *Respirometry in activated sludge*. 1993. Tese de Doutorado. Spanjers.
- STAPLETON, P. J.; LUNDON, D. J.; MCWADE, R.; SCANLON, N.; HANNAN, M. M.; O'KELLY, F.; LYNCH, M. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* urinary isolates and comparison with antibiotic consumption data over 10 years, 2005–2014. *Irish Journal Of Medical Science* (1971 -), [s.l.], v. 186, n. 3, p.733-741, 4 jan. 2017.
- STAVELEY, Jane P.; SMRCHEK, Jerry C. Algal Toxicity Test. *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, [s.l.], p.181-202, 2005.
- STEPHENSON, Tom; JUDD, Simon; JEFFERSON, Bruce; BRINDLE, Keith. *Membrane bioreactors for wastewater treatment*. London: Iwa Publishing, 2000. 150 p.
- SUÁREZ, Sonia; CARBALLA, Marta; OMIL, Francisco; LEMA, Juan M. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews In Environmental Science And Bio/technology*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.125-138, 30 jan. 2008.
- SUBTIL, Eduardo Lucas; HESPANHOL, Ivanildo; MIERZWA, José Carlos. Biorreatores com membranas submersas (BRMs): alternativa promissora para o tratamento de esgotos sanitários para reúso. *Rev. Ambient. Água*. 2013, vol.8, n.3, pp.129-142.
- SURERUS, V.; GIORDANO, G.; TEIXEIRA, L. A. C. Activated sludge inhibition capacity index. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, [s.l.], v. 31, n. 2, p.385-392, jun. 2014.
- TAHERAN, Mehrdad; BRAR, Satinder K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R.Y.; ZHANG, T.C.; VALERO, J.R. Membrane processes for removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) from water and wastewaters. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 547, p.60-77, mar. 2016.
- TAMBOSI, José Luiz; SENA, Rênio Felix de; FAVIER, Maxime; GEBHARDT, Wilhelm; JOSÉ, Humberto Jorge; SCHRÖDER, Horst Friedrich; MOREIRA, Regina de Fátima Peralta Muniz. Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes. *Desalination*, [s.l.], v. 261, n. 1-2, p.148-156, 2010.

- TANGERINO, E. P; BERNARDO, L. Di. Remoção de substâncias húmicas por meio da oxidação com ozônio e peróxido de hidrogênio e FiME. *Eng Sanit Ambient*, São Paulo, v. 10, n. 4, p.290-298, out. 2005.
- TATARAZAKO, Norihisa; ODA, Shigeto. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.197-203, 18 jan. 2007.
- TESTA, Bernard. Emergent chemodiversity: The case of stereoisomerism in acyclic alkanes. *Chirality*, [s.l.], v. 29, n. 8, p.415-421, 4 jul. 2017.
- TORRES, P. (1992). *Desempenho de um reator de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários*. 185 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.
- TRAN, Ngoc Han; CHEN, Hongjie; REINHARD, Martin; MAO, Feijian; GIN, Karina Yew-Hoong. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. *Water Research*, [s.l.], v. 104, p.461-472, nov. 2016.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology - A new branch of toxicology: A general survey of its aims methods, and prospects. *Ecological Toxicology Research*, New York, p.3-23, 1975.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Linder, G., J. Greene, H. Ratsch, J. Nwosu, S. Smith, and D. Wilborn. *Seed germination and root elongation toxicity tests in hazardous waste site evaluation: methods development and applications*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/D-89/109 (NTIS PB90113184), 1989.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). United States. *Guidelines for Water Reuse*. Washington, D.c: Cdm Smith, 2012. 643 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). United States. *White Paper: Aquatic life criteria for contaminants of emerging concern – Part I: General challenges and recommendations*. Washington, D.C.: OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup, 2008. 86 p.
- URBANCZYK, H.; AST, J. C.; HIGGINS, M. J.; CARSON, Jeremy; DUNLAP, Paul V. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, [s.l.], v. 57, n. 12, p.2823-2829, 1 dez. 2007.
- VAN BOECKEL, Thomas P; GANDRA, Sumanth; ASHOK, Ashvin; CAUDRON, Quentin; GRENFELL, Bryan T.; ALEVIN, Simon; LAXMINARAYAN, Ramanan. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, [s.l.], v. 14, n. 8, p.742-750, ago. 2014.

- VAN HAANDEL, A.; CAVALCANTI, P. F. F.; CATUNDA, S. Y. C.; FERNANDES, J. G. S. *Uso da Respirometria para Controle de Sistemas de Lodo Ativado*. In: Seminário de Meio Ambiente em Indústrias de Processo. São Paulo. 147-161 p. 1998.
- VAN LOOSDRECHT, Mark C. M.; NIELSEN, Per Halkjaer; LOPEZ-VAZQUEZ, Carlos M. *Experimental Methods in Wastewater Treatment*. London: Iwa Publishing, 2016. 362 p.
- VANROLLEGHEM, Peter A. Principles of Respirometry in Activated Sludge Wastewater Treatment. *Biomath*, Belgium, 2002.
- VASCONCELOS, E. C. de; DALKE, C. R.; OLIVEIRA, C. M. R. de. Influence of Select Antibiotics on *Vibrio fischeri* and *Desmodesmus subspicatus* at  $\mu\text{g L}^{-1}$  Concentrations. *Environmental Management*, [s.l.], v. 60, n. 1, p.157-164, 8 mar. 2017.
- VENTOLA, C. Lee. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy And Therapeutics*, [s.l.], v. 40, n. 4, p.277-283, abr. 2015.
- VERCELLINO, Rebeca do Amaral; SALEMI, Luiz Felipe; ANDRADE, Tatiana Morgan Berteli de; SILVA, Robson Willians da Costa; VIDAS, Natassia Bonivi; CAMARGO, Plínio Barbosa de. Efluentes de Estação de Tratamento de Esgoto: Efeito Sobre à Qualidade de Água de Um Rio de Pequeno Porte. *Nativa*, [s.l.], v. 3, n. 2, p.131-134, 25 jun. 2015.
- VERNOUILLET, Gabrielle; EULLAFFROY, Philippe; LAJEUNESSE, André; BLAISE, Christian; GAGNÉ, François; JUNEAU, Philippe. Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere*, [s.l.], v. 80, n. 9, p.1062-1068, ago. 2010.
- VIRKUTYTE, Jurate; VARMA, Rajender S; JEGATHEESAN, Veeriah (Ed.). *Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater*. London: Iwa Publishing, 2010. 520 p.
- VON SPERLING, M. *Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos*. 3. ed. Belo Horizonte: DESA - UFMG, 2005. 452 p.
- VON SPERLING, M. *Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias - Lodos Ativados*. v. 4. Belo Horizonte: DESA - UFMG, 1997.
- WANG, Jun; LIU, Qi; ZHANG, Guangchun; LI, Zhanshuang; YANG, Piaoping; JING, Xiaoyan; ZHANG, Milin; LIU, Tianfu; JIANG, Zhaohua. Synthesis, sustained release properties of magnetically functionalized organic-inorganic materials: Amoxicillin anions intercalated magnetic layered double hydroxides via calcined precursors at room temperature. *Solid State Sciences*, [s.l.], v. 11, n. 9, p.1597-1601, set. 2009.
- WANG, Meie; ZHOU, Qixing. Single and joint toxicity of chlorimuron-ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 60, n. 2, p.169-175, fev. 2005.
- WANG, Xiao-chun; SHEN, Ji-min; CHEN, Zhong-lin; ZHAO, Xia; XU, Hao. Removal of pharmaceuticals from synthetic wastewater in an aerobic granular sludge membrane bioreactor and determination of the bioreactor microbial diversity. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 100, n. 18, p.8213-8223, 28 maio 2016.

- WANG, Ying; HUANG, Xia; YUAN, Qipeng. Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic/aerobic membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 40, n. 5, p.1733-1739, abr. 2005.
- WANG, Yonggang; WANG, Xu; LI, Mingwei; DONG, Jing; SUN, Changhong; CHEN, Guanyi. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) from Municipal Waste Water with Integrated Membrane Systems, MBR-RO/NF. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, [s.l.], v. 15, n. 2, p.269-281, 5 fev. 2018.
- WATKINSON, A.J.; MURBY, E.J.; COSTANZO, S.D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, [s.l.], v. 41, n. 18, p.4164-4176, out. 2007.
- WATKINSON, A.J.; MURBY, E.J.; KOLPIN, D.W.; COSTANZO, S.D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 407, n. 8, p.2711-2723, abr. 2009.
- WATTS, CHRIS *et al.*. Desk based review of current knowledge on pharmaceuticals in drinking water and estimation of potential levels. [s.l.]: Watts And Crane Associates, 2007. 107 p.
- WESTERHOFF, Paul; YOON, Yeomin; SNYDER, Shane; WERT, Eric. Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes. *Environmental Science & Technology*, [s.l.], v. 39, n. 17, p.6649-6663, 2005.
- WIN, Theint Theint; KIM, Hyemin; CHO, Kangwoo; SONG, Kyung Guen; PARK, Joonhong. Monitoring the microbial community shift throughout the shock changes of hydraulic retention time in an anaerobic moving bed membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 202, p.125-132, fev. 2016.
- WOLLENBERGER, L; HALLING-SØRENSEN, B; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, [s.l.], v. 40, n. 7, p.723-730, abr. 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *The Right to Water*. 35. ed. Switzerland: United Nations High Commissioner for Human Rights, 2010. 61 p.
- XIA, Siqing; JIA, Renyong; FENG, Fan; XIE, Kang; LI, Haixiang; JING, Danfeng; XUA, Xiaotian. Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 106, p.36-43, fev. 2012.
- XIAO, Yeyuan; YAOHARI, Hazarki; ARAUJO, Cecilia de; SZE, Chun Chau; STUCKEY, David C. Removal of selected pharmaceuticals in an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) with/without powdered activated carbon (PAC). *Chemical Engineering Journal*, [s.l.], v. 321, p.335-345, ago. 2017.
- XU, Haomin; COOPER, William J.; JUNG, Jinyoung; SONG, Weihua. Photosensitized degradation of amoxicillin in natural organic matter isolate solutions. *Water Research*, [s.l.], v. 45, n. 2, p.632-638, jan. 2011.

- YAMAMOTO, K.; HIASA, M.; MAHMOOD, T.; MATSUO, T. Direct solid–liquid separation using hollow fiber membrane in an activated-sludge aeration tank. *Water Science & Technology*, v. 21, p. 43–54, 1989.
- YIN, Junfa; MENG, Zihui; DU, Mingjun; LIU, Cong; SONG, Maoyong; WANG, Hailin. Pseudo-template molecularly imprinted polymer for selective screening of trace  $\beta$ -lactam antibiotics in river and tap water. *Journal Of Chromatography A*, [s.l.], v. 1217, n. 33, p.5420-5426, ago. 2010.
- YU, Dawei; CHEN, Yutao; WEI, Yuansong; WANG, Jianxing; WANG, Yawei; LI, Kun. Fouling analysis of membrane bioreactor treating antibiotic production wastewater at different hydraulic retention times. *Environmental Science And Pollution Research*, [s.l.], v. 24, n. 10, p.9026-9035, 13 nov. 2015.
- ZHANG, Xiaojing; ZHANG, Nan; WANG, Lina; ZHENG, Kaiwei; FU, Haoqiang; CHEN, Tao; ZHANG, Hongzhong; YAN, Yixin. Bioactivity and microbial community structure of nitrite-oxidizing bacteria in five membrane bioreactors operated as CANON process with different C/N ratio. *Ecological Engineering*, [s.l.], v. 99, p.159-163, fev. 2017.
- ZHANG, Yongjun; GEIßEN, Sven-uwe; GAL, Carmen. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, [s.l.], v. 73, n. 8, p.1151-1161, nov. 2008.
- ZHANG, Yu; CHEN, Zhimin; AN, Wei; XIAO, Shumin; YUAN, Hongying; ZHANG, Dongqing; YANG, Min. Risk assessment of Giardia from a full scale MBR sewage treatment plant caused by membrane integrity failure. *Journal Of Environmental Sciences*, [s.l.], v. 30, p.252-258, abr. 2015.
- ZHOU, Yan; XU, Yan-Bin; XU, Jia-Xin; ZHANG, Xiao-Hua; XU, Shi-Hui; DU, Qing-Ping. Combined Toxic Effects of Heavy Metals and Antibiotics on a Pseudomonas fluorescens Strain ZY2 Isolated from Swine Wastewater. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 16, n. 2, p.2839-2850, 27 jan. 2015.
- ZOPPAS, Fernanda Miranda; BERNARDES, Andrea Moura; MENEGUZZI, Álvaro. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, [s.l.], v. 21, n. 1, p.29-42, mar. 2016.
- ZUCCATO, Ettore; CASTIGLIONI, Sara; BAGNATI, Renzo; MELIS, Manuela; FANELLI, Roberto. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, [s.l.], v. 179, n. 1-3, p.1042-1048, jul. 2010.