

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
ENGENHARIA AMBIENTAL

BRUNA MASSARO DE OLIVEIRA

Influência de fenômenos cometabólicos na biodegradação anaeróbia do antimicrobiano sulfametazina presente em água residuária de suinocultura

São Carlos, SP
2016

Bruna Massaro de Oliveira

Influência de fenômenos cometabólicos na biodegradação anaeróbia do antimicrobiano sulfametazina presente em água residuária de suinocultura

Trabalho de Graduação apresentado à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP), para obtenção do título de Graduada em Engenharia Ambiental.

Orientador: Dr. Guilherme Henrique Duarte de Oliveira

São Carlos, SP
2016

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

D894i de Oliveira, Bruna Massaro
Influência de fenômenos cometabólicos na
biodegradação anaeróbia do antimicrobiano sulfametazina
presente em água residuária de suinocultura / Bruna
Massaro de Oliveira; orientador Guilherme Henrique
Duarte de Oliveira. São Carlos, 2016.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2016.

1. Biodegradação Anaeróbia. 2. Cometabolismo. 3.
Sulfametazina. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Bruna Massaro de Oliveira**

Data da Defesa: 11/11/2016

Comissão Julgadora:

Guilherme Henrique Duarte de Oliveira (Orientador(a))

Luiz Antonio Daniel

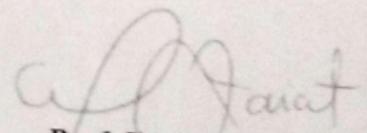
Eugenio Foresti

Resultado:

APROVADA

APROVADA

Aprovada



Prof. Dr. Marcelo Zaiat
Coordenador da Disciplina 1800091 - Trabalho de Graduação

Agradecimentos

À minha mãe, Vanderci por ser um grande exemplo de dedicação. Aos meus pais, Vanderci e Carlos, pelo apoio e amor incondicionais que foram indispensáveis para o meu crescimento e por sempre acreditarem no meu potencial, me incentivando a correr atrás dos meus objetivos. Ao meu irmão Victor, pelo carinho, paciência e apoio durante todos esses anos.

Ao Guilherme de Oliveira pela orientação e auxílio durante esse trabalho e por ser um excelente professor, sempre paciente e disposto a compartilhar suas experiências. Meu respeito e gratidão.

Ao professor Marcelo Zaiat pela orientação durante a iniciação científica e por ser um professor preocupado com o desenvolvimento de seus alunos.

Ao Cassiano pelo carinho, companheirismo e por compartilhar seus conhecimentos computacionais que facilitaram minha vida durante a graduação.

A todos da Amb 011 pela amizade e por todos os bons momentos compartilhados. Em especial à Gabi pela amizade e pela parceira em praticamente todos os trabalhos em grupo dessa graduação, ao Dendê, à Carol, Bia e Cebola por serem grandes amigos.

A todos os professores da Engenharia Ambiental da EESC por contribuírem com a minha formação.

Resumo

OLIVEIRA, B. M. **Influência de fenômenos cometabólicos na biodegradação anaeróbia do antimicrobiano sulfametazina presente em água residuária de suinocultura.** São Carlos, 2016. 78p. Monografia de Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2016.

A presença de antibióticos no meio ambiente tem sido foco de estudo pela comunidade científica. O principal risco associado à contaminação ambiental por esses compostos é a indução de resistência bacteriana. Foram detectados antibióticos em diversos compartimentos ambientais, sendo as águas residuárias a principal fonte de contaminação, indicando que os sistemas de tratamento convencionais não são capazes de remover esses compostos de forma eficiente. Além disso, os fenômenos fundamentais envolvidos na biodegradação anaeróbia dos antimicrobianos ainda não foram completamente compreendidos. Acredita-se que esses compostos podem ser biodegradados através de cometabolismo. Com o intuito de otimizar as eficiências de remoção de antimicrobianos em sistemas de biodegradação anaeróbios são necessários estudos dos processos metabólicos envolvidos na biodegradação desses compostos. Esse trabalho teve como objetivos investigar a ocorrência de cometabolismo na biodegradação anaeróbia do antimicrobiano sulfametazina (SMZ) em água residuária sintética similar a um efluente de suinocultura, definir quais constituintes orgânicos da água residuária sintética contribuem de maneira mais efetiva com a biodegradação de SMZ e a quais etapas metabólicas da biodegradação desses constituintes está associada à biodegradação de SMZ. Os resultados obtidos sugerem que a remoção de DQO e SMZ estão associadas, sendo provável que a biodegradação de SMZ ocorra por cometabolismo. Os compostos que contribuem efetivamente para a biodegradação de SMZ são extrato de carne, sacarose, glicose e frutose. Além disso, é possível que biodegradação de SMZ ocorra durante as etapa de acidogênese da degradação anaeróbia.

Palavras-Chave: Biodegradação Anaeróbia, Sulfametazina, cometabolismo.

Abstract

OLIVEIRA, B. M. **The influence of cometabolism on the anaerobic biodegradation of sulfamethazine in swine wastewater.** São Carlos, 2016. 78p. Monografia de Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2016.

The presence of antibiotics in the environment has been studied by the scientific community. The major risk associated to their environmental presence is the possibility of microbial resistance promotion. Antibiotics have been detected in many environmental compartments, which is an indicator that conventional wastewater treatment plants are generally not capable of efficiently removing these compounds. Furthermore, the fundamental phenomena of antibiotic anaerobic biodegradation are not fully understood, and it is expected that these compounds are biodegraded by cometabolism. Studies of the metabolic processes responsible for the biodegradation of these compounds are required in order to optimize the removal efficiencies of antibiotics in anaerobic wastewater treatment systems. This work aimed to investigate the occurrence of cometabolism in the anaerobic biodegradation of the antimicrobial sulfamethazine (SMZ) in synthetic wastewater similar to the real swine wastewater, and to determine which organic compound contributes most effectively to the biodegradation of SMZ and which metabolic steps of anaerobic degradation is related to SMZ biodegradation. The results suggest that the SMZ and COD removal are linked and it is likely that cometabolism plays a role during SMZ removal. Beef extract, sucrose, glucose and fructose are the tested compounds that effectively contribute to the biodegradation of SMZ. Hence it is possible that the cometabolism is associated with the acidogenesis step of the anaerobic biodegradation.

Keywords: Anaerobic Biodegradation, sulfamethazine, cometabolism.

Lista de Figuras

Figura 1 -Estrutura química da SMZ	20
Figura 2 - Principais rotas do metabolismo anaeróbico. Adaptado de SPEECE (1983).	25
Figura 3 - Esquema experimental da Linha 1, Etapa 1	32
Figura 4 - Esquema do reator diferencial (Fonte: RIBEIRO, 2005).....	38
Figura 5 - Linha 1, Etapa 0: Perfil temporal da concentração de SMZ ao longo do ensaio abiótico em batelada	40
Figura 6 - Linha 1, Etapa 1: Perfil temporal da DQO ao longo da batelada 1.....	41
Figura 7 - Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO e SMZ ao longo da batelada 2.....	43
Figura 8 – Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO e SMZ ao longo da batelada 3	43
Figura 9 - Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO e SMZ ao longo da batelada 4.....	43
Figura 10 – Linha 1, Etapa 1: Ajuste do perfil temporal de DQO da Batelada 2	44
Figura 11 – Linha 1, Etapa 1: Ajuste do perfil temporal de DQO da Batelada 3	45
Figura 12 – Linha 1, Etapa 1: Ajuste do perfil temporal de DQO da Batelada 4	45
Figura 13 - Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO nas bateladas 5,6 e 7.....	47
Figura 14 – Linha 1, Etapa 2: Perfil Temporal da DQO com agitação de 60 rpm	49
Figura 15 - Linha 1, Etapa 2: Perfil temporal da DQO com agitação de 90 rpm	50
Figura 16 – Linha 1, Etapa 2: Perfil temporal da DQO a uma agitação de 120 rpm.....	51
Figura 17 – Linha 2, Etapa 1: Porcentagens de SMZ biodegradada e adsorvida	56
Figura 18 - Esquema simplificado da degradação anaeróbia de proteínas e carboidratos.....	59
Figura 19 – Linha 2, Etapa 1: Porcentagens de SMZ biodegradada e adsorvida	60
Figura 20 – Linha 2, Etapa 2 utilizando extrato de carne: Porcentagens de remoção de SMZ por Biodegradação e por Adsorção	62
Figura 21 - Linha 2, Etapa 2 utilizando extrato de carne: Relação entre SMZ biodegradada e matéria orgânica removida.....	63
Figura 22 - Linha 2, Etapa 2 utilizando sacarose: Porcentagens de SMZ removida por biodegradação e por adsorção.....	65
Figura 23 - Linha 2, Etapa 2 utilizando sacarose: Relação entre SMZ biodegradada e matéria orgânica removida.....	65
Figura 24 – Linha 2 – Etapa 3: Perfil temporal da SMZ e DQO com extrato como fonte de matéria orgânica.....	67

Figura 25 – Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido propiônico com extrato como fonte de matéria orgânica.....	68
Figura 26 – Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido acético com extrato como fonte de matéria orgânica.....	68
Figura 27 – Linha 2, Etapa 3: Perfis temporais da SMZ e DQO com sacarose como fonte de matéria orgânica.....	69
Figura 28 – Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido propiônico com sacarose como fonte de matéria orgânica.....	70
Figura 29 – Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido acético com sacarose como fonte de matéria orgânica.....	70

Lista de tabelas

Tabela 1 - Condições operacionais das bateladas	30
Tabela 2 - Objetivos e métodos das etapas experimentais.....	Error! Bookmark not defined.
Tabela 3 - Composição inorgânica da água residuária sintética	35
Tabela 4 - Composição orgânica da água residuária sintética	35
Tabela 5 - Parâmetros de ajuste dos dados experimentais	44
Tabela 6 - Condições operacionais das bateladas 5, 6 e 7	45
Tabela 7 - Resultados das análises de Sólidos	46
Tabela 8 - Variação da concentração de SSV	50
Tabela 9 - Eficiência de remoção de SMZ	55
Tabela 10 - Remoção percentual de DQO para diferentes fontes de matéria orgânica	56

Lista de Siglas

ETE – Estação de Tratamento de Efluentes

DQO – Demanda Química de Oxigênio

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

SMZ – Sulfametazina

SMX - Sulfametoxazol

SST - Sólidos Suspensos Totais

SSV - Sólidos Suspensos Voláteis

ST - Sólidos Totais

STV - Sólidos Totais Voláteis

UV – Ultravioleta

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	Efeitos dos Antibióticos no Meio Ambiente.....	17
2.2.	Sulfonamidas	18
2.3.	Sulfametazina.....	19
2.4.	Degradação de Antimicrobianos.....	20
2.5.	Cometabolismo	21
2.6.	Biodegradação Anaeróbia.....	23
2.7.	Remoção de antibióticos em Reatores Anaeróbios.....	24
2.8.	Parâmetros Cinéticos Intrínsecos.....	25
2.9.	Modelos Cinéticos de Crescimento Microbiano e de Consumo de Substrato.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1.	Procedimento Experimental.....	30
4.1.1.	Linha de Investigação 1 – Determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos.....	30
4.1.2.	Linha de Investigação 2 – Avaliação da ocorrência de cometabolismo	31
4.2.	Inóculo	34
4.3.	Água Residuária Sintética.....	34
4.4.	Reator Anaeróbio de Leito Fixo Diferencial	35
4.5.	Métodos Analíticos	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1.	Determinação dos Parâmetros Cinéticos Intrínsecos – Linha de Investigação 1	37
5.1.1.	Linha 1, Etapa 0 - Ensaios Abióticos.....	37
5.1.2.	Linha 1, Etapa 1. Variação da velocidade intersticial.....	38
5.1.3.	Linha 1, Etapa 2. Variação da Agitação da Mesa Agitadora.....	47
5.1.3.1.	Batelada com agitação de 60 rpm.....	47

5.1.3.2.	Batelada com agitação de 90 rpm	48
5.1.3.3.	Batelada com agitação de 120 rpm	49
5.2.	Avaliação do Cometabolismo	51
5.2.1.	Linha 2 - Etapa 1. Variação dos compostos fornecedores de matéria orgânica	51
5.2.2.	Linha 2 - Etapa 2. Variação da DQO inicial	59
5.2.3.	Linha 2 – Etapa 3. Perfil temporal de degradação de SMZ e DQO.....	64
6	CONCLUSÃO.....	70
7	BIBLIOGRAFIA	71

1 1 INTRODUÇÃO

O crescente uso de produtos farmacêuticos tem contribuído para a contaminação do ambiente aquático, uma vez que as tecnologias tradicionais de tratamento de efluentes não são capazes de removê-los de maneira eficaz (GARCÍA GALÁN et al., 2012).

A contaminação do ambiente aquático gerada por esses produtos tem despertado o interesse da comunidade científica, pois grande parte desses compostos são biologicamente ativos e muitos de seus efeitos no ambiente são ainda desconhecidos. São conhecidos, porém, alguns efeitos ecotoxicológicos graves, tais como a indução de mudança de sexo em determinadas populações de peixes, devido à inserção de hormônios no ambiente; mudanças nos ciclos biogeoquímicos que prejudicam o desenvolvimento de plantas aquáticas; aumento da resistência a antibióticos em comunidades microbianas que constitui um risco a saúde humana (DAUGHTON e TERNES, 1999).

A forma principal de entrada dos produtos farmacêuticos no ambiente aquático é por meio dos efluentes das estações de tratamento de esgoto (ETE). Eles também podem chegar ao ambiente por meio de efluentes hospitalares, efluentes de indústrias farmacêuticas e efluentes de atividades agropecuárias (DÍAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2007).

A presença de antibióticos nos efluentes de ETEs aponta a ineficácia dos sistemas de tratamentos tradicionais em remover esses compostos (WATIKISON et al., 2009). Diante do potencial ecotoxicológico e do risco a saúde humana promovido pela presença dessas substâncias no meio ambiente vê-se a necessidade de buscar formas alternativas para a sua remoção.

A biodegradação é citada como um mecanismo eficiente na remoção de antibióticos (TRAN et al., 2009). Entretanto, na literatura observa-se uma lacuna no conhecimento a respeito dos fenômenos fundamentais envolvidos na biodegradação dos antibióticos. Diversos autores indicaram o cometabolismo como processo responsável pela biodegradação de produtos farmacêuticos (TRAN et al., 2009, OTTMAR et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2016, FISCHER e MAJEWSKI, 2014).

O conhecimento mais aprofundado a respeito dos processos de metabólicos envolvidos na remoção de antibióticos e dos parâmetros operacionais que podem influenciar nessa degradação pode contribuir com a otimização dos sistemas biológicos de tratamento de efluentes, aumentando a eficiência de remoção dos antimicrobianos.

O presente trabalho é composto por duas linhas de investigação distintas.

Inicialmente, o trabalho teve como objetivo a avaliação da cinética de degradação anaeróbia do antimicrobiano sulfametazina em condições de minimização da resistência à transferência de massa nas fases líquida e sólida, para a obtenção de parâmetros cinéticos intrínsecos que seriam utilizados na modelação e simulação de um reator anaeróbio em escala de bancada (no restante deste trabalho, essa linha de investigação será referida como Linha 1). Inseridos no contexto de um projeto de pesquisa de doutoramento em execução no LPB, os experimentos utilizaram a biomassa imobilizada de um reator anaeróbio em escala de bancada adaptado para a remoção do antimicrobiano por meio de uma operação de longo prazo (superior a um ano). Entretanto, constatou-se que a biomassa utilizada não manteve a sua atividade metanogênica após a retirada do reator original e inoculação dos reatores diferenciais utilizados no presente trabalho. Esse comportamento prejudicou a obtenção de parâmetros cinéticos que fossem representativos do reator original.

Optou-se, então, por dar prosseguimento ao trabalho de pesquisa por outra linha de investigação. Tomando-se como base dados publicados na literatura científica e resultados experimentais obtidos em outras pesquisas no LPB, o trabalho foi adaptado para investigar a ocorrência de fenômenos cometabólicos durante a biodegradação anaeróbia da sulfametazina e a sua dependência dos constituintes orgânicos presentes nos meios sintéticos alimentados aos reatores biológicos (Linha 2). Os resultados obtidos são apresentados em detalhe e discutidos segundo a sua relevância frente ao atual conhecimento acerca da biodegradação de fármacos em águas residuárias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Efeitos dos Antibióticos no Meio Ambiente

O consumo de produtos farmacêuticos cresceu muito na última década, aumentando o despejo desses produtos no meio ambiente. Dentre os produtos farmacêuticos, a presença de antibióticos nos compartimentos ambientais tem recebido atenção da comunidade científica, desde o primeiro caso reportado de contaminação de águas por antibióticos, ocorrido em 1982 na Inglaterra (SARMAH et al., 2006)

Os antibióticos são frequentemente utilizados nas medicinas humana e veterinária devido à sua capacidade de inibir o crescimento microbiano. A quantidade e os grupos de antibióticos consumidos são muito variáveis entre diferentes países (KUMMERER, 2009).

Esses compostos podem ser utilizados para fins terapêuticos, profiláticos, ou como promotores de crescimento, resultando em um aumento da eficiência alimentar dos animais (DRILLIA et al., 2005). O uso de antibióticos em quantidades sub-terapêuticas com a finalidade de prevenir doenças e/ou promover crescimento é uma prática comum em atividades agropecuárias e, Kummerer (2009) associa a prática a seleção de bactérias resistentes.

Um fator importante que contribui com a chegada de antibióticos ao meio ambiente é a taxa de metabolização desses compostos, que pode variar entre 10% e 90%. A fração não metabolizada dos antibióticos é excretada e chega ao meio na forma ativa do composto (KUMMERER, 2009).

Os principais riscos ambientais decorrentes da presença de antibióticos no meio ambiente são a seleção e a transferência de genes resistentes e o potencial de efeitos tóxicos em organismos não-alvo, além de sua natureza persistente (SANTOS, 2010).

Não é possível afirmar com grau de certeza adequado que as concentrações de antibióticos presentes em águas residuárias são suficientes para exercer pressão de seleção necessária para promover os organismos resistentes. É mais provável que a seleção de organismos resistentes ocorra dentro do organismo do animal em tratamento, onde a concentração de antibióticos é muito mais elevada (HÖLZEL et al., 2010). A presença de microrganismos resistentes em águas residuárias provavelmente oferece um risco maior em termos de veiculação de genes resistentes do que a presença de antibióticos em si (KUMMERER, 2009).

A indução de resistência é um processo complexo que ainda não foi completamente compreendido. Porém, sabe-se que a resistência microbiana a antibióticos constitui um grave risco

à saúde humana e animal, uma vez que reduz a eficiência de tratamentos a infecções bacterianas (SANTOS, 2010).

De acordo com Santos (2010), os antibióticos podem ser classificados como extremamente tóxicos para microrganismos e muito tóxicos para algas. Boxall et al. (2003) relataram que as cianobactérias são sensíveis a determinados antibióticos. Sendo as cianobactérias constituintes da base da cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos, quando populações dessa alga sofrem desequilíbrio os efeitos prejudiciais podem se estender a outros compartimentos do ecossistema. Os efeitos tóxicos dos antibióticos também podem ser prejudiciais a biota do solo, uma vez que são prejudiciais aos microrganismos presentes nessa biota (BARAN et al., 2011).

A principal fonte de emissão de antimicrobianos em termos de volume é o esgoto sanitário, porém, as concentrações desses compostos no esgoto são entre pg.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em efluentes hospitalares observam-se concentrações muito superiores de antimicrobianos, sendo assim, uma fonte pontual de poluição considerável (VERLICCHI et al., 2012). Outra fonte relevante de emissão de antibióticos é a atividade de criação intensiva de animais. Baran et al. (2011) sugerem que o uso veterinário é a maior fonte de poluição por antibióticos.

Ainda há um grau de incerteza relacionado à magnitude dos efeitos ambientais decorrentes da presença de antibióticos no meio ambiente. Para evitá-los faz-se necessário o controle do uso e da emissão desses compostos ao meio ambiente (KUMMERER, 2009). Apesar da lacuna existente a respeito dos potenciais impactos ambientais, observa-se o risco potencial que esses compostos oferecem ao meio ambiente e à saúde pública. Assim, é importante realizar estudos e desenvolver tecnologias que evitem a chegada de antibióticos ao ambiente.

2.2. Sulfonamidas

As sulfonamidas compõem uma classe de antibióticos utilizada na medicina humana e veterinária. Foram os primeiros antimicrobianos capazes de garantir sucesso no tratamento de doenças infecciosas em humanos (GARCÍA-GALÁN et al., 2008).

Atualmente, seu uso na medicina humana é raro, sendo utilizado apenas para o tratamento de doenças bastante específicas (HOFF, 2008). Entretanto, quantidades elevadas de sulfonamidas têm sido utilizadas na medicina veterinária e para a criação de animais, como promotores de crescimento ou auxiliando na melhoria da eficiência alimentar. Características importantes que fazem das sulfonamidas um risco para o meio ambiente são sua capacidade de permanecer no

ambiente durante um longo período de tempo e sua colaboração efetiva na geração de resistência antimicrobiana em comunidades bacterianas (BARAN et al., 2011).

Atualmente, as atividades agropecuárias são as principais responsáveis pela presença de sulfonamidas no ambiente (BARAN et al., 2011). A utilização desses compostos em atividades de suinocultura e na criação intensiva de gado é uma prática comum, destacando-se a suinocultura por frequentemente fazer uso desses compostos (HOFF, 2008).

2.3. Sulfametazina

A sulfametazina (SMZ) é um antimicrobiano pertencente ao grupo das sulfonamidas, considerada a sulfonamida mais utilizada na medicina veterinária (MOHRING et al., 2009). A SMZ é comumente encontrada no ambiente, sendo originada, principalmente, de águas residuárias de criação intensiva de suínos (MASON et al., 2008). A estrutura química da sulfametazina é mostrada na Figura 1.

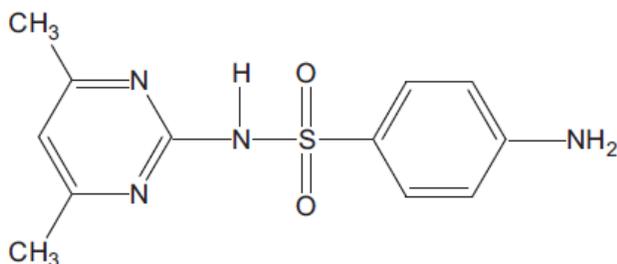


Figura 1 -Estrutura química da SMZ

De acordo com o levantamento feito por Baran et al. (2011), a concentração de SMZ no ambiente pode variar entre $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 100mg.L^{-1} , dependendo do compartimento ambiental no qual é encontrada, sendo maior próximo às fontes de emissão e diminuindo conforme se distancia das mesmas. Os principais compartimentos ambientais em que os autores observaram a presença de sulfonamidas, listados em ordem crescente de concentração foram: oceanos, águas subterrâneas, águas superficiais, esgoto após tratamento, esgoto municipal sem tratamento, efluente hospitalar, lodos ativados, solo, escoamento de atividades agrícolas, lixiviado de aterros e excretas dos animais.

A biodegradabilidade das sulfonamidas é dependente de seu radical substituinte.. Estudos demonstraram que a sulfametazina apresenta maior resistência à biodegradação que as

sulfonamidas sulfatiazol (BARAN et al., 2011), sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina (MOHRING et al., 2009).

2.4. Degradação de Antimicrobianos

A presença de diferentes compostos antimicrobianos, entre eles as sulfonamidas, no ambiente sugere que as alternativas convencionais de tratamento de efluentes não tem sido uma barreira efetiva no impedimento da contaminação ambiental.

Verlicchi et al. (2012) realizaram um levantamento analisando a capacidade de remoção de produtos farmacêuticos, dentre estes 36 antibióticos, em 264 sistemas de tratamento de esgoto municipais, sendo 244 lodos ativados convencionais e 20 reatores biológicos de membrana. As concentrações de antibióticos observadas nos afluentes as ETEs variou entre 0,001 e 32 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nos efluentes das ETEs analisados, as concentrações variaram entre 0,001 e 6,7 $\mu\text{g.L}$. A variabilidade das eficiências de remoção desses compostos em diferentes sistemas é extremamente alta. Para lodos ativados ficou entre 0% e 98%; já para reatores biológicos com membrana foi entre 15% e 94%. As diferenças nas propriedades físicas e químicas entre os compostos avaliados contribuem para as altas variações das eficiências de remoção, pois suas propriedades fazem com que os compostos se comportem de maneiras distintas em sistemas de tratamento, alterando a sua solubilidade, a tendência à adsorção, biodisponibilidade e biodegradabilidade. (VERLICCHI et al., 2012).

Estudos relatados por Onesios et al. (2009) apontam para uma enorme variação na eficiência de remoção de diferentes antimicrobianos e outros produtos farmacêuticos em sistemas biológicos de tratamento. No caso dos antibióticos, as eficiências de remoção ficaram entre 0% e 100%, tanto para sistemas em escala de laboratório quanto para sistemas em escala real. Os autores atribuíram essa variação a diversos fatores como a concentração inicial dos compostos, tempo e condições de incubação, origem do lodo de inoculação e condições experimentais variadas.

Larcher et al. (2012) discutem os resultados existentes na literatura a respeito da biodegradação do antimicrobiano sulfametoxazol, da classe das sulfonamidas. Os autores relatam grandes variabilidades nas eficiências de remoção obtidas em estudos com lodos ativados e em ETEs em escala real. As tecnologias que se mostraram mais promissoras na biodegradação do antimicrobiano foram biorreatores de membrana e tecnologias baseadas na biodegradação anaeróbia desse composto.

A literatura apresenta resultados inconsistentes a respeito das eficiências de remoção de antibióticos, com variações de eficiência extremamente altas. Muitos fatores podem interferir nos resultados observados, entre eles estão: as características físico-químicas dos compostos, as condições operacionais e o tipo de sistema de tratamento empregado. Diante disso, seria mais promissor caracterizar os mecanismos de remoção dos antibióticos em sistemas biológicos de tratamento. Isso possibilitaria justificar as eficiências de remoção obtidas e encontrar alternativas de tratamento adequadas para a remoção desses compostos.

A biodegradação é vista como uma das tecnologias mais promissoras na remoção de produtos farmacêuticos, pois tem potencial de degradação completa de poluentes e é de baixo custo (TRAN et al., 2013)

Alguns autores defendem que a adsorção ao lodo é um fenômeno de remoção importante para algumas classes de antibióticos (KUMMERER, 2009 e VERLLICH et al., 2012). Oliveira et al. (2016) sugerem que os principais mecanismos responsáveis pela remoção do antimicrobiano sulfametazina em condições anaeróbias são a biodegradação e a adsorção à biomassa, sendo a primeira predominante.

Existem diferentes estudos relacionados ao tratamento biológico de produtos farmacêuticos, sendo, em sua maioria, referentes a sistemas aeróbios de tratamento, mais precisamente a sistemas de lodos ativados (PÉREZ et al., 2005). Entretanto, o conhecimento a respeito da eficiência de remoção desses compostos em sistemas anaeróbios é escasso. Então à medida que a tecnologia anaeróbia ganha importância, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos relacionados a eficiência desses sistemas na remoção de compostos antimicrobianos. Além disso, as rotas metabólicas e as contribuições potenciais de grupos microbianos relevantes para a biodegradação desses compostos ainda não são totalmente compreendidos (TRAN et al., 2013).

2.5. Cometabolismo

A concentração em que os antimicrobianos estão presentes no meio é um fator importante que deve ser considerado ao analisar sua biodegradabilidade. Comumente, esses compostos estão presentes em concentrações da ordem de ng.L^{-1} ou poucos mg.L^{-1} , quantidades muito baixas e geralmente insuficientes para fornecer a energia necessária para a manutenção da atividade microbiana e indução de enzimas responsáveis pela sua biodegradação. Nesses casos, a

biodegradação do composto depende da ocorrência de cometabolismo, que é o processo no qual a transformação do micropoluinte ocorre somente na presença de um substrato de crescimento (TRAN et al., 2013).

A definição formal de cometabolismo, dada por Dalton e Stirling (1982), é a transformação de um substrato que não fornece energia para sustentar o crescimento microbiano na presença obrigatória de um substrato de crescimento. O cometabolismo ocorre devido à inespecificidade fortuita de enzimas e cofatores que permitem a transformação de compostos que não fornecem energia para o crescimento (CRIDDLE, 1993).

A quantificação da quantidade de matéria orgânica biodegradada por metabolismo e cometabolismo é extremamente difícil. Entretanto, é claro que vários compostos não oferecem suporte ao crescimento dos microrganismos e ainda sim são biodegradados (DALTON e STIRLING, 1982).

Hovarth (1972) sugere que o cometabolismo pode ser um fenômeno bioquímico útil para elucidar uma diversidade de transformações enzimáticas. De fato, o cometabolismo já foi utilizado para a investigação de mecanismos enzimáticos, evolução enzimática, produção de compostos de importância industrial, investigação de rotas metabólicas, investigação da degradação de pesticidas, hidrocarbonetos derivados de petróleo, compostos aromáticos, produtos tóxicos, produtos farmacêuticos e, atualmente, se mostra uma alternativa para a compreensão da biodegradação de antibióticos (DALTON e STIRLING, 1982; TRAN et al., 2013; FISCHER e MAJEWSKI, 2014).

Para Fischer e Majewski (2014), a diferenciação entre processos metabólicos e cometabólicos é importante e, em muitos casos, indispensável para a racionalização e otimização das eficiências de remoção de determinados poluentes. Os autores fizeram um levantamento de estudos a respeito da influência do cometabolismo na biodegradação de diversos micropoluentes, entre eles os antibióticos, mostrando que este processo metabólico é, de fato, muito importante na biodegradação de diversos compostos.

A avaliação da literatura existente sugere uma lacuna no entendimento de processos cometabólicos. Grande parte dos estudos foi feita utilizando concentrações de micropoluentes superiores às observadas no meio ambiente e faltam estudos a respeito do potencial de contribuição que grupos enzimáticos específicos tem em transformações cometabólicas (FISCHER E MAJEWSKI, 2014).

Diversos estudos sugerem que o cometabolismo tem um papel de destaque na biodegradação de antibióticos (TRAN et al, 2013; OLIVEIRA et al., 2016; FISCHER E MAJEWSKI, 2014). Portanto, a investigação de fenômenos cometabólicos pode contribuir com entendimento dos fenômenos fundamentais, como as rotas metabólicas e grupos enzimáticos relevantes envolvidos na biodegradação desses compostos e pode auxiliar na otimização das eficiências de remoção de antibióticos em sistemas de tratamento.

2.6. Biodegradação Anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo comumente utilizado no tratamento da matéria orgânica presente em águas residuárias. Trata-se de um processo no qual um grupo heterogêneo de microrganismos converte matéria orgânica complexa, como carboidratos, lipídios e proteínas em produtos mais simples, utilizando seu metabolismo (SPEECE, 1983). Essa tecnologia foi aplicada com sucesso no tratamento de diferentes efluentes, tanto em países com clima tropical quanto em regiões de climas subtropicais e temperados (SEGHEZZO et al., 1998).

Os sistemas de tratamento anaeróbios apresentam vantagens como: facilidade na operação, são compactos e possuem baixo requerimento de energia (requerem menos área e energia que os sistemas aeróbios), baixa produção de lodo (também menor que a produção em sistemas aeróbios) e baixa necessidade de nutrientes e produtos químicos (SEGHEZZO et al., 1998; AIYUK et al., 2005).

O processo de digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas, são elas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na hidrólise a matéria orgânica complexa, composta por moléculas com alto peso molecular é convertida em compostos orgânicos mais simples, como aminoácidos, ácidos graxos e mono e dissacarídeos por bactérias fermentativas. Na acidogênese, as bactérias fermentativas convertem esses compostos orgânicos em moléculas mais simples, como ácidos orgânicos e álcoois. Então ocorre a etapa da acetogênese na qual as bactérias acetogênicas consomem os ácidos orgânicos liberando gás hidrogênio, gás carbônico e acetato, que serão convertidos em metano e gás carbônico durante a metanogênese (CHERNICHARO, 1997). A Figura 2 ilustra as principais rotas do metabolismo anaeróbio.

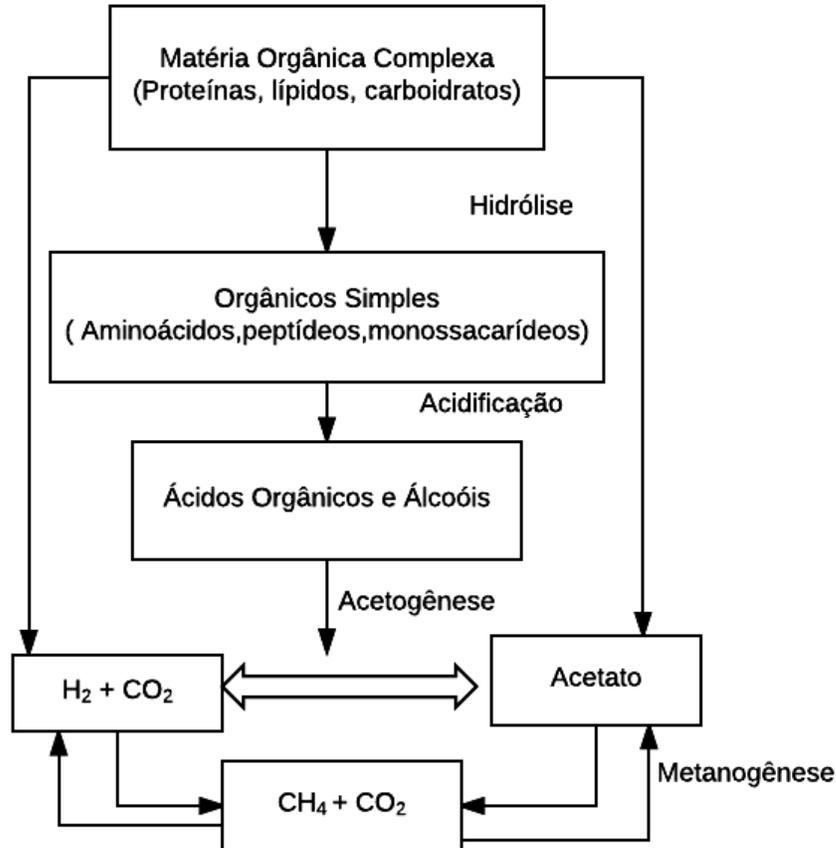


Figura 2 - Principais rotas do metabolismo anaeróbico adaptado de SPEECE (1983).

2.7. Remoção de antibióticos em Reatores Anaeróbios

O conhecimento a respeito do potencial de degradação de antimicrobianos em sistemas anaeróbios ainda é escasso. Spielmeyer et al. (2015) avaliou o potencial da fermentação anaeróbia na eliminação de quatro antibióticos de uso comum na medicina veterinária, entre eles duas sulfonamidas, sulfadiazina e sulfametazina em uma planta de produção de biogás. As eficiências de remoção ficaram entre 14% e 89%. Os fatores responsáveis pela degradação desses compostos, assim como os produtos gerados durante o processo de remoção ainda não foram totalmente compreendidos. Além disso, concentrações de até 38 mg.kg⁻¹ de sulfonamidas não provocaram efeitos negativos sob a produção de biogás.

Cetecioglu et al. (2015) utilizaram um reator anaeróbico em bateladas sequenciais para avaliar a biodegradação do antimicrobiano sulfametoxazol em água residuária de indústria farmacêutica.

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento anaeróbio é adequada para efluentes com concentrações de até 40 mg.L⁻¹ de sulfametoxazol, uma vez que concentrações superiores desse composto apresentaram efeitos tóxicos à comunidade microbiana.

Oliveira (2016) estudou a remoção de sulfametazina em três diferentes tipos de reatores anaeróbios, um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), um reator anaeróbio de mistura e biomassa imobilizada (RAMBI) e um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), em todos eles foram observadas remoções de SMZ foi iguais ou superiores a 70%. Além disso, o autor observou que a quantidade de matéria orgânica disponível e o controle de parâmetros operacionais contribuem com a biodegradação anaeróbia do antimicrobiano.

A literatura sugere que diversos antimicrobianos da classe das sulfonamidas não tem efeitos tóxicos em sistemas de digestão anaeróbia quando presentes em concentrações próximas das observadas usualmente em águas residuárias. Porém, quando presentes em concentrações superiores a 40 mg.L⁻¹ as sulfonamidas apresentam efeitos prejudiciais aos sistemas com biodegradação anaeróbia (SPIELMEYER et al., 2015; CARBALLA et al., 2007 e MOHRING et al., 2009).

Diversos autores sugerem a biodegradação anaeróbia como uma alternativa promissora para o tratamento de águas residuárias contaminadas com antibióticos (OLIVEIRA, 2016; CARBALLA et al, 2007, CETECIOGLU et al., 2015). Além disso, apesar de os reatores anaeróbios terem sido amplamente estudados, parâmetros fundamentais para sua otimização e aumento de escala nem sempre estão disponíveis (ZAIAT et al., 1996b).

A utilização de reatores anaeróbios com biomassa imobilizada permite elevado desempenho e estabilidade no tratamento de efluentes, devido a sua capacidade de manter altos tempos de retenção celular mesmo com baixos tempos de detenção hidráulica (ZAIAT et al., 1996b).

2.8. Parâmetros Cinéticos Intrínsecos

O estudo cinético de um processo biológico envolve as velocidades de crescimento dos microrganismos, além do consumo de substrato e geração de produtos.

Os parâmetros cinéticos são de extrema importância na modelação dos processos bioquímicos que ocorrem nos reatores anaeróbios; são eles que determinam as taxas de conversão e permitem fazer previsões relacionadas ao desempenho do reator biológico (ZAIAT et al., 1996b).

O conhecimento sobre fenômenos fundamentais do funcionamento de reatores anaeróbios com biomassa imobilizada, como: parâmetros cinéticos intrínsecos, coeficientes de transferência de massa das fases líquida e sólida e avaliação do fenômeno de cisalhamento do biofilme são imprescindíveis para a melhora do projeto e operação desses reatores (VIEIRA et al., 1997).

A determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos auxilia na modelação de reatores anaeróbios para o tratamento de um determinado efluente, auxiliando assim a otimização do processo e facilitando o aumento de escala desses sistemas de tratamento. Ou seja, diferentemente dos parâmetros cinéticos aparentes que só podem ser aplicados sobre condições de funcionamento específicas, os parâmetros cinéticos intrínsecos podem ser extrapolados para a obtenção de condições de funcionamento diferentes daquelas em que foram obtidos. Para a obtenção de parâmetros intrínsecos se fazem necessários ensaios específicos para esse fim, que promovam a minimização das resistências à transferência de massa interna e externa.

A obtenção de parâmetros cinéticos sem levar em consideração a resistência à transferência de massa entre o líquido e superfície da biopartícula, bem como a resistência a transferência de massa intraparticular faz com que os parâmetros encontrados sejam apenas válidos para as condições de funcionamento específicas nas quais foram obtidas, ou seja, só permite a obtenção parâmetros cinéticos aparentes (ZAIAT et al., 1996b).

O transporte de nutrientes e substratos entre a fase líquida e as biopartículas em sistemas de tratamento biológico utilizando biomassa imobilizada é o que promove a ocorrência das reações bioquímicas de degradação. Espera-se, então, que haja uma diferença na concentração desses componentes na camada líquida e na interface sólido-líquido em reatores heterogêneos, essa diferença deve-se à resistência à transferência de massa externa, que limita a transferência de massa na camada estagnante de líquido circundando a biopartícula. Além disso, observa-se um perfil de concentração de substrato no interior da biopartícula, devido a resistência a transferência de massa na fase sólida (ZAIAT et al., 2000).

Com o intuito de obter os parâmetros cinéticos intrínsecos, pode-se minimizar a resistência a transferência de massa externa aumentando a velocidade superficial do líquido no interior do reator até atingir a condição onde essa resistência é desprezível. Entretanto é importante observar que velocidades muito elevadas podem provocar o desprendimento do biofilme prejudicando o funcionamento do sistema (ZAIAT et al., 1996c).

2.9. Modelos Cinéticos de Crescimento Microbiano e de Consumo de Substrato

Para o bom entendimento do processo de degradação dos poluentes é necessário o uso de modelos matemáticos. A modelação matemática do crescimento da população microbiana pode ser feita a partir do modelo proposto por Monod (Equação 2.1), que relaciona o crescimento microbiano com a concentração do substrato limitante.

$$u = u_{max} * \frac{C_s}{C_s + K_m}$$

(Equação 2.1)

Em que:

μ = taxa específica de crescimento dos microrganismos (h^{-1});

μ_{max} = taxa específica máxima de crescimento dos microrganismos (h^{-1});

C_s = Concentração do substrato limitante ($mg.L^{-1}$);

K_m = Constante de meia saturação ($mg.L^{-1}$).

Oliveira et al. (2016) observaram que o processo de degradação da sulfametazina em sistema anaeróbio é afetado pela presença de matéria orgânica, sugerindo a ocorrência de cometabolismo.

A modelação matemática de fenômenos de cometabolismo pode ser feita de acordo com o modelo desenvolvido por Criddle (1993). A descrição do processo de degradação da sulfametazina na presença de matéria orgânica pode ser feita a partir da equação proposta por Oliveira et al. (2016), (Equação 2.2), que é uma adaptação do modelo de Criddle.

$$r_{SMZ} = (T_{SMZ}^{DQO} \cdot r_{DQO} + k_{SMZ}) \left(\frac{C_{SMZ}}{K_{SMZ} + C_{SMZ}} \right)$$

(Equação 2.2)

Em que:

r_{SMZ} = velocidade de biodegradação de sulfametazina ($\mu g.L^{-1}.h^{-1}$);

T_{SMZ}^{DQO} = capacidade de transformação do substrato de crescimento ($\mu g.mg O_2^{-1}$);

r_{DQO} = velocidade de remoção de DQO ($mg O_2.L^{-1}.h^{-1}$);

k_{SMZ} = velocidade máxima de biodegradação de sulfametazina na ausência de matéria orgânica de fácil degradação ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

C_{SMZ} = concentração de sulfametazina na fase aquosa ($\mu\text{g.L}^{-1}$);

K_{SMZ} = constante de meia saturação ($\mu\text{g.L}^{-1}$);

O modelo proposto por Oliveira et al. (2016) sugere uma relação entre a velocidade de remoção de DQO (substrato de crescimento) e a velocidade de remoção de SMZ (substrato cometabólico), ou seja, a biodegradação de SMZ depende da quantidade de matéria orgânica disponível no meio.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral da Linha de Investigação 1 deste projeto foi a avaliação da cinética de degradação anaeróbia do antimicrobiano sulfametazina em condições de minimização da resistência à transferência de massa nas fases líquida e sólida.

Os objetivos específicos desta linha foram:

- i) Obtenção das velocidades de degradação de SMZ;
- ii) Ajuste do modelo cinético que melhor represente o fenômeno reativo;
- iii) Estimativa das constantes cinéticas intrínsecas da degradação de SMZ.

O objetivo geral referente Linha de Investigação 2 foi a avaliação dos mecanismos envolvidos no processo de biodegradação anaeróbia da sulfametazina, mais especificamente, a avaliação da ocorrência de cometabolismo.

Os objetivos específicos desta linha de pesquisa foram:

- i) Identificação de quais constituintes orgânicos da água residuária sintética similar a um efluente real de suinocultura contribuem de maneira efetiva com a remoção de SMZ;
- ii) Identificar em qual etapa da degradação desse composto ocorre a biodegradação de sulfametazina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedimento Experimental

4.1.1. Linha de Investigação 1 – Determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos

A Linha de Investigação 1 teve três etapas experimentais. As Etapas 0 e 1 foram realizadas com reatores diferenciais operados em bateladas simples, sendo reinoculados após cada ensaio, para a obtenção de perfis temporais de concentração de sulfametazina e DQO, mantidos em câmara de controle de temperatura a 30°C durante aproximadamente 96 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Na Etapa 0 da Linha 1 os reatores diferenciais foram preenchidos com espuma sem biomassa e alimentados com solução aquosa de SMZ, com o intuito de verificar a ocorrência de remoção de SMZ por adsorção às paredes do reator ou as espumas utilizadas. Acompanhou-se o perfil temporal da concentração de SMZ.

Na Etapa 1 da Linha 1 foram realizadas sete bateladas com diferentes velocidades superficiais e/ou diluição do meio. A Tabela 4.1 apresenta as condições operacionais dos experimentos.

Tabela 1 - Condições operacionais das bateladas

Experimento	Velocidade superficial (cm.min⁻¹)	DQO de entrada (mg O₂.L⁻¹)
Batelada 1	0,06	1297
Batelada 2	0,60	830
Batelada 3	1,32	794
Batelada 4	3,24	756
Batelada 5	4,13	650
Batelada 6	4,13	405
Batelada 7	4,80	311

O cálculo da velocidade superficial do líquido no interior do reator segue a Equação 4.1.

$$V_s = \frac{Q}{\varepsilon * A}$$

(Equação 4.1)

Em que: Q é a vazão do líquido, A é a área da seção transversal do reator e ε é porosidade do leito, obtida experimentalmente por meio da medição do volume escoado dos reatores com biomassa imobilizada, $\varepsilon = 0,574$.

O esquema experimental da Etapa 1 da Linha 1 está na Figura 3.

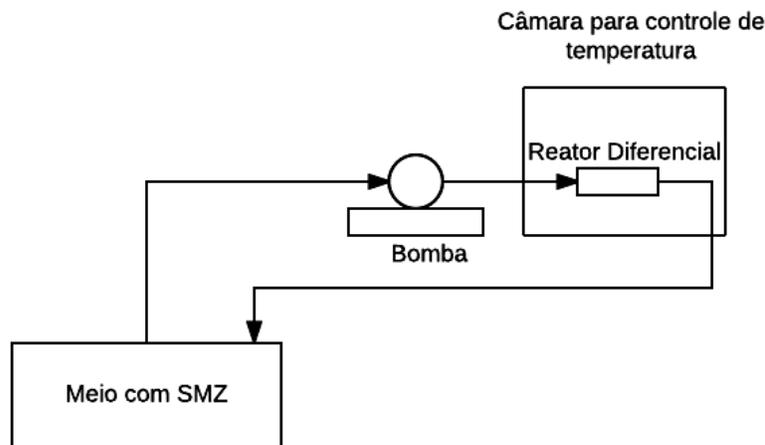


Figura 3 - Esquema experimental da Linha 1, Etapa 1

Durante a Etapa 2 da Linha 1, foram realizados experimentos em batelada sequencial, em que os reatores não foram reinoculados após cada ensaio, apenas o meio reacional foi trocado entre os ensaios. Para esses experimentos, foram utilizados frascos de vidro de 500 mL com biomassa imobilizada, mantidos em mesa agitadora em diferentes velocidades de agitação, de acordo com o método proposto por Vieira (1996) para obtenção dos parâmetros cinéticos intrínsecos. Os ensaios foram realizados em triplicata com duração de 48 horas, para a obtenção de perfis temporais de DQO, mantidos em câmara de controle de temperatura a 30°C, com DQO inicial de 500 mg O₂.L⁻¹. Testaram-se quatro intensidades de agitação: 60 rpm, 90 rpm, 120 rpm e 150 rpm. Entre as bateladas retirou-se 3 espumas de cada reator para análise do sólidos.

4.1.2. Linha de Investigação 2 – Avaliação da ocorrência de cometabolismo

Perante os resultados insatisfatórios obtidos nos experimentos da Linha 1, optou-se pela mudança de linha de investigação para a Linha 2, relativa à avaliação do efeito do cometabolismo na remoção de SMZ.

A Linha de Investigação 2 teve 3 etapas experimentais, denominadas Etapa 1, 2 e 3. O procedimento experimental adotado na Etapa 1 da Linha 2 foi a realização de bateladas em frascos de antibiótico com 20 mL de meio reacional, variando o composto responsável pelo fornecimento de matéria orgânica. As condições foram experimentadas em quintuplicata, com DQO inicial nominal de 1000 mg O₂.L⁻¹, concentração inicial de SMZ de aproximadamente 10 µg.L⁻¹ e concentração de 5,98 g.L⁻¹ de sólidos suspensos voláteis. Os frascos de vidro foram mantidos fechados com tampa de butila com o objetivo de garantir condição anaeróbia ao longo do ensaio. O ensaio foi conduzido em câmara com temperatura controlada a 30°C durante 72 horas. Foram feitas análises de DQO e quantificação de SMZ ao início e ao final do experimento.

Os compostos testados como fonte de carbono foram amido, celulose, sacarose, extrato de carne, óleo, glicose, frutose, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico, sendo esses componentes do meio sintético ou compostos resultantes da degradação desses componentes.

Na Etapa 2 da Linha 2 foram feitas bateladas sob as mesmas condições experimentais, porém variando a quantidade de matéria orgânica inicial. Foram testados extrato de carne e sacarose como fontes individuais de carbono com as seguintes DQO iniciais: 500 mg O₂.L⁻¹, 1500 mg O₂.L⁻¹, 2000 mg O₂.L⁻¹, 2500 mg O₂.L⁻¹.

A Etapa 3 da Linha 2 consistiu na avaliação do perfil temporal de degradação de DQO e SMZ e a produção de ácidos graxos voláteis. Essa etapa foi realizada em frascos de vidro com 800 mL de meio reacional mantidos em mesa agitadora com uma intensidade de agitação de 120 rpm e DQO inicial de 3000 mg O₂.L⁻¹, novamente com extrato de carne e sacarose fornecendo matéria orgânica individualmente. As demais condições experimentais foram mantidas.

As etapas experimentais realizadas com seus objetivos e métodos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Objetivos e métodos das etapas experimentais

Etapa	Objetivos	Método
Linha 1, Etapa 0. Ensaio Abióticos	Mensurar a adsorção nas paredes do sistema e no material suporte	Obtenção de um perfil temporal com o reator diferencial preenchido com espumas não inoculadas utilizando apenas solução aquosa de sulfametazina.
Linha 1, Etapa 1. Variação da velocidade intersticial	Determinar a condição em que se elimina a resistência a transferência de massa externa	Variação das velocidades intersticiais testadas (Foram utilizados valores apresentados na literatura (VIEIRA et al., 1997, ZAIAT et al., 1996a e ZAIAT et al., 1996b).
Linha 1, Etapa 2. Variação da Agitação da Mesa Agitadora	Determinar a condição em que se elimina a resistência a transferência de massa externa para reatores em batelada.	Realização de ensaios variando a agitação da mesa agitadora (os valores utilizados seguiram os encontrados em literatura (VIEIRA et al., 1996)
Linha 2, Etapa 1. Variação dos compostos fornecedores de matéria orgânica	Determinar quais compostos tem maior influência na remoção de SMZ.	Realização uma batelada na qual a concentração inicial de matéria orgânica foi a mesma mas a fonte desta foi proveniente de diferentes compostos.
Linha 2, Etapa 2. Variação da DQO inicial	Avaliar a influência que o aumento na quantidade de matéria orgânica inicial tem na remoção de SMZ.	Realização ensaios variando a DQO inicial com a mesma concentração de SMZ inicial.
Linha 2, Etapa 3. Obtenção do perfil temporal de SMZ e DQO	Avaliar o perfil temporal de degradação de SMZ e matéria orgânica e de ácidos orgânicos.	Realização de ensaios acompanhando a variação da concentração de SMZ, DQO e ácidos graxos voláteis durante 72 horas.

4.2. Inóculo

Os reatores utilizados na Linha 1 foram inoculados com biomassa anaeróbia fixada em matrizes cúbicas de poliuretano de 5 mm de aresta, proveniente de um Reator Anaeróbio de Mistura Contínua tratando água residuária sintética contaminada com sulfametazina. Esse reator encontrava-se em operação há mais de 300 dias, em um experimento em andamento no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). A biomassa foi coletada manualmente e inserida nos reatores diferenciais ao início de cada batelada. Na Etapa 1, cada reator foi inoculado com 150 matrizes cúbicas, na Etapa 2 cada frasco foi inoculado com 1000 matrizes cúbicas.

Para os experimentos realizados na Linha 2, utilizou-se lodo anaeróbio granular proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) tratando água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dacar, Tietê/SP). Cerca de 40 grânulos do lodo anaeróbio foram inoculados em frascos de antibiótico contendo 20 mL de meio reacional, resultando em uma concentração inicial de biomassa de $5,98 \pm 0,52 \text{ g SSV.L}^{-1}$.

4.3. Água Residuária Sintética

Todos os experimentos foram realizados utilizando uma água residuária sintética complexa. Os componentes inorgânicos da água residuária sintética foram baseados na proposta de Bergmann et al. (2000). O objetivo é que esse efluente sintético tenha uma composição e características físico-químicas próximas às encontradas em efluentes reais de suinocultura, em termos de nutrientes, pH, força iônica total e capacidade de tamponamento. A água residuária sintética já foi utilizada com bons resultados em estudos de degradação de sulfametazina presente em águas residuárias de suinocultura por Oliveira et al. (2016).

A composição orgânica da água residuária sintética baseou-se na proposta de Oliveira (2016). Os constituintes orgânicos utilizados foram extrato de carne em pó, sacarose, amido solúvel, celulose e óleo de soja comercial.

A Tabela 3 contém os constituintes inorgânicos e a Tabela 4 contém os constituintes orgânicos da água residuária sintética.

Tabela 3 - Composição inorgânica da água residuária sintética

Sal	Concentração (mg.L ⁻¹)	Sal	Concentração (mg.L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	3,89	KH ₂ PO ₄	430,6
MnCl ₂ .4H ₂ O	3,17	CaCl ₂	337,8
ZnSO ₄ .7H ₂ O	13,5	KCl	623,9
CuCl ₂ .2H ₂ O	3,25	MgCl ₂ .6H ₂ O	334,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05	K ₂ SO ₄	152,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,10	FeSO ₄ .7H ₂ O	39,20
NaNO ₃	1,27	NaHCO ₃	1512
		NH ₄ Cl	1500

Tabela 4 - Composição orgânica da água residuária sintética

Constituinte Orgânico	Concentração (mg.L ⁻¹)
Extrato de Carne	876
Sacarose	306
Amido Solúvel	920
Celulose	306
Óleo de soja (µL.L ⁻¹)	705

4.4. Reator Anaeróbio de Leito Fixo Diferencial

O reator anaeróbio de leito fixo diferencial representa um elemento diferencial (sem gradiente) de um reator de leito fixo, e já foi empregado com sucesso na determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos (ZAIAT et al., 1996a, ZAIAT et al., 1996b)

Os reatores diferenciais são construídos em acrílico, com diâmetro interno de 2,5 cm e 5,1 cm de comprimento. A Figura 3 contém um desenho esquemático do reator diferencial utilizado.

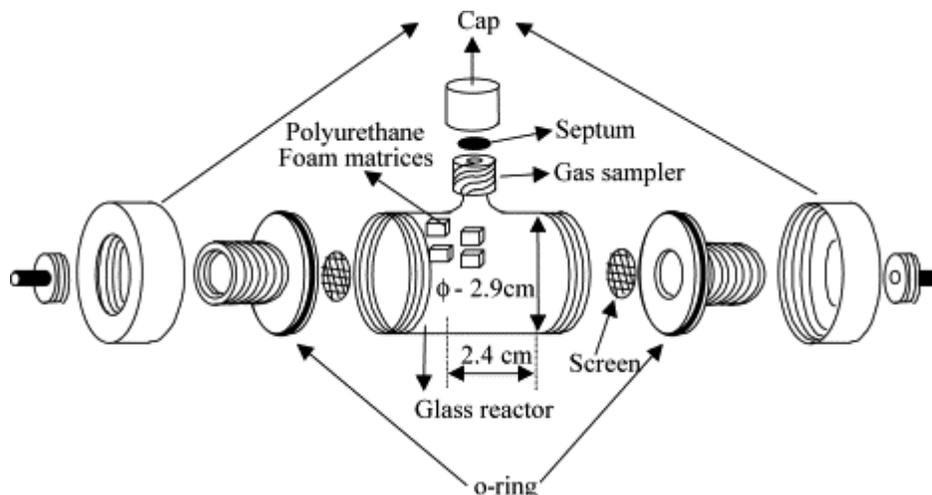


Figura 4 - Esquema do reator diferencial (Fonte: RIBEIRO, 2005)

4.5. Métodos Analíticos

As análises físico-químicas de monitoramento dos reatores anaeróbios foram conduzidas segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005) para as análises de demanda química de oxigênio (DQO), pH; sólidos totais e suspensos, voláteis e fixos.

Todas as amostras obtidas nos experimentos referentes a Linha de Investigação 1 foram filtradas em membranas de 0,2 μm antes das análises de DQO.

As amostras obtidas nos experimentos referentes à Linha de Investigação 2 não foram filtradas antes das análises de DQO. As amostras obtidas ao final dos experimentos foram submetidas a centrifugação para a retirada do excesso de sólidos antes da realização das análises.

O antimicrobiano sulfametazina foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência seguida por espectrometria de massas em tandem, acoplados por interface electrospray (HPLC-ESI-MS/MS), desenvolvido e validado por Gomes et al. (2015).

A quantificação de ácidos graxos voláteis das amostras da etapa 3 da Linha de Investigação 2 foi feita de acordo com o método descrito por Penteadó et al. (2013) que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência e detecção de ultravioleta (HPLC-UV). As amostras de 1,0 mL foram filtradas em membranas de 0,2 μm de diâmetro com a adição de 40 μL de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ antes da injeção no sistema Shimadzu utilizado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Intrínsecos – Linha de Investigação 1

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nas bateladas realizadas nos reatores diferenciais, nas quais variou-se a vazão de alimentação, obtendo-se assim diferentes velocidades superficiais do líquido no interior dos reatores.

Em todos os gráficos apresentados as barras verticais representam um desvio padrão das amostras.

5.1.1. Linha 1, Etapa 0 - Ensaio Abióticos

Os Ensaio Abióticos foram realizados com a finalidade de verificar a adsorção da sulfametazina nas paredes do sistema e no material suporte, sem a presença de matéria orgânica. Para isso, realizou-se uma batelada com 72 horas de duração e dois reatores diferenciais com velocidade superficial de $0,06 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$, funcionando em duplicata com solução aquosa de sulfametazina a uma concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, medindo-se a concentração de SMZ a cada intervalo de tempo. A Figura 5 apresenta a variação temporal de concentração de sulfametazina (foram utilizadas as concentrações médias de SMZ dos dois reatores).

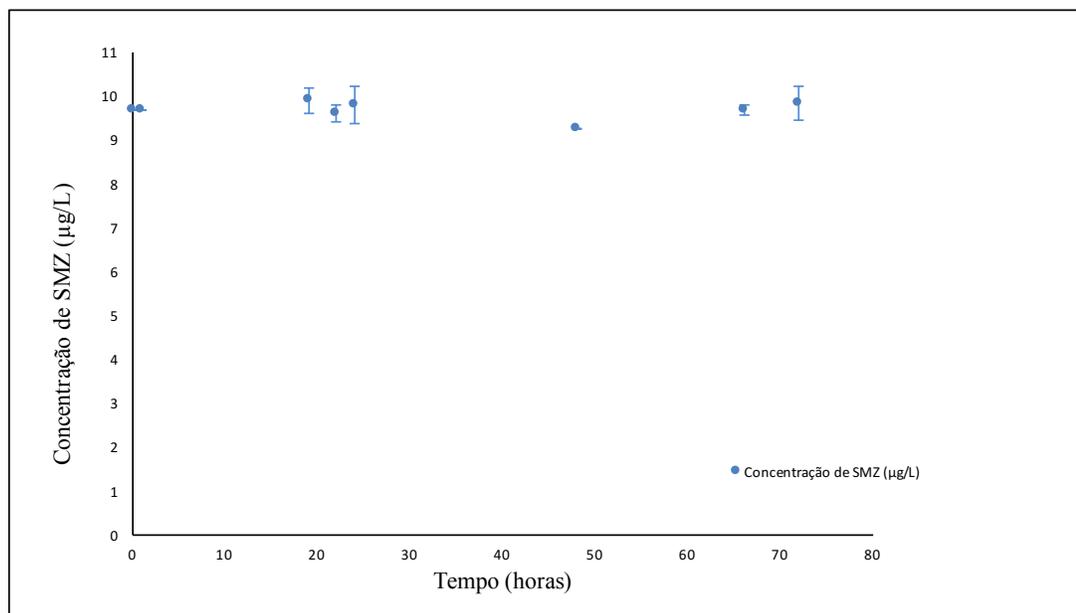


Figura 5 – Linha 1, Etapa 0: Perfil temporal da concentração de SMZ ao longo do ensaio abiótico em batelada

A partir dos dados apresentados é possível dizer que a concentração de SMZ não sofreu alterações significativas ao longo do ensaio. O desvio padrão calculado para esse conjunto de amostras foi de $0,19 \mu\text{g.L}^{-1}$ que representa apenas 2% do valor médio ($9,67 \mu\text{g.L}^{-1}$), portanto não houve adsorção significativa nem as paredes dos reatores nem ao material suporte, logo ambos são adequados para a realização das etapas seguintes. Também não houve degradação de SMZ pela ação de luz ou calor.

5.1.2. Linha 1, Etapa 1. Variação da velocidade intersticial

- Batelada 1

A velocidade superficial aplicada foi de $0,06 \text{ cm.min}^{-1}$ com DQO de entrada de $1298 \pm 26 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ e teve duração de 96 horas. A Figura 6 apresenta o perfil temporal de DQO.

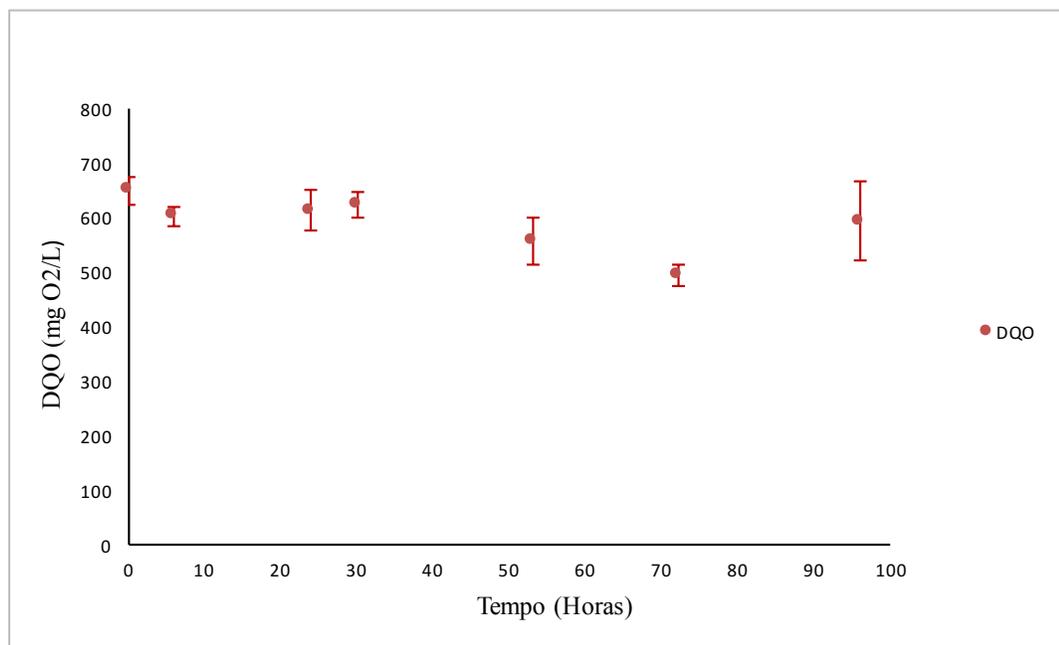


Figura 6 – Linha 1, Etapa 1: Perfil temporal da DQO ao longo da batelada 1

Observou-se remoção de DQO insignificante ao longo do ensaio. Levantou-se a hipótese de que a relação entre a DQO inicial e a biomassa do sistema, $3,71 \text{ g O}_2 \cdot \text{g SSV}^{-1}$, foi muito elevada e poderia ter inibido a comunidade metanogênica e, portanto, impedindo a remoção de DQO do meio. Optou-se por diluir o meio nas etapas seguintes reduzindo assim a DQO inicial do sistema.

- Batelada 2

Nesse experimento adotaram-se os seguintes parâmetros operacionais: velocidade superficial do líquido no interior do reator igual a $0,6 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ e metade da concentração de matéria orgânica utilizada no experimento anterior, resultando em uma DQO inicial de $834 \pm 60 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Os resultados obtidos são representados na Figura 7.

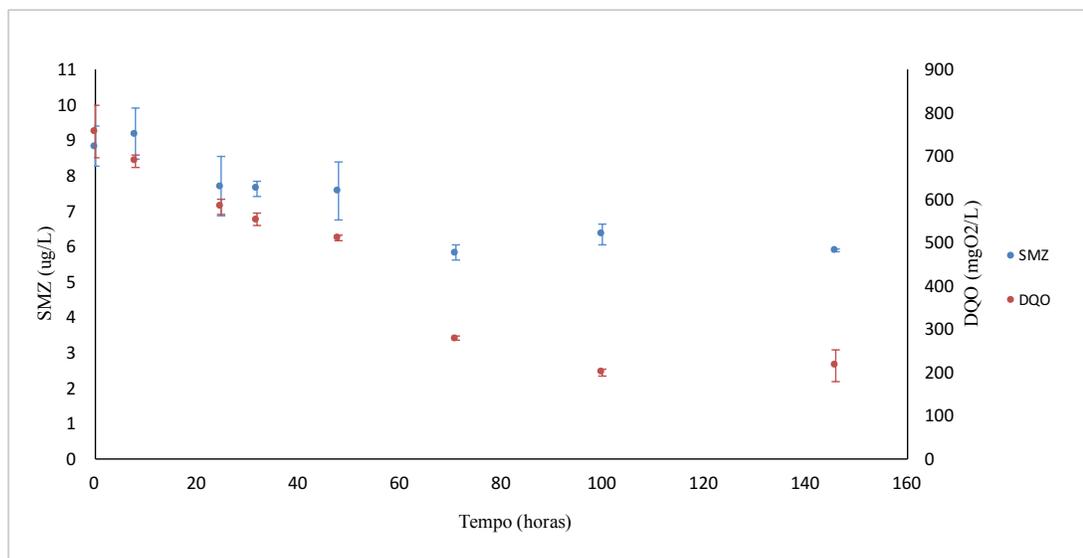


Figura 7 – Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO e SMZ ao longo da batelada 2

A remoção de DQO observada foi de aproximadamente 44% e observou-se, também, remoção de SMZ de cerca de 19,5%. A degradação conjunta de matéria orgânica e sulfametazina sugere a ocorrência de cometabolismo desses compostos. Tal resultado já era esperado e foi obtido anteriormente por Oliveira et al. (2016).

- Bateladas 3 e 4

As condições experimentais aplicadas às Bateladas 3 e 4 foram velocidades superficiais 1,32 cm.min⁻¹ e 3,24 cm.min⁻¹ e DQO inicial de 794 mg O₂.L⁻¹ e 756 mg O₂.L⁻¹, respectivamente. A Figura 8 apresenta os resultados obtidos na Batelada 3 e a Figura 9 apresenta os resultados da Batelada 4.

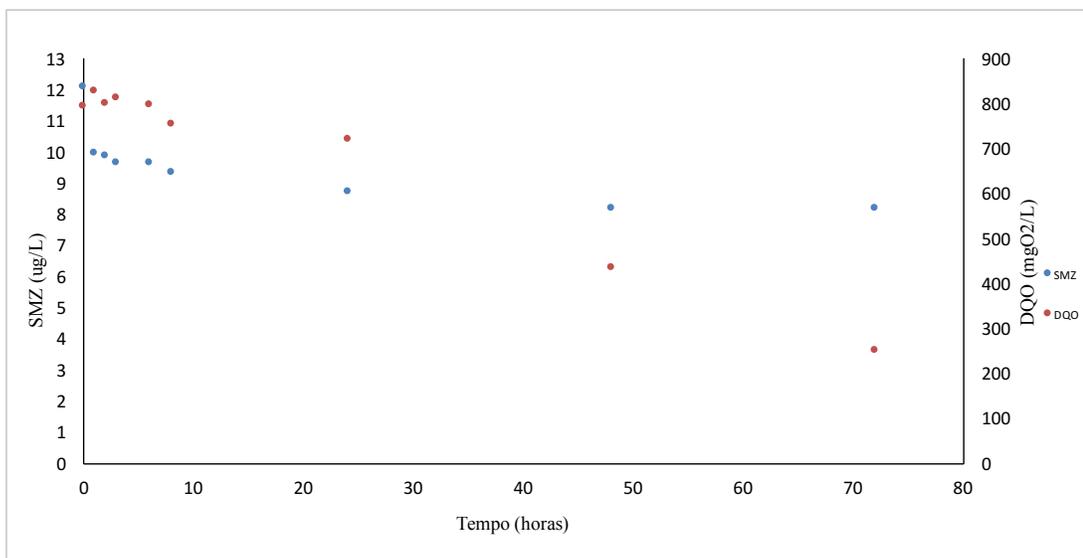


Figura 8 – Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO e SMZ ao longo da batelada 3

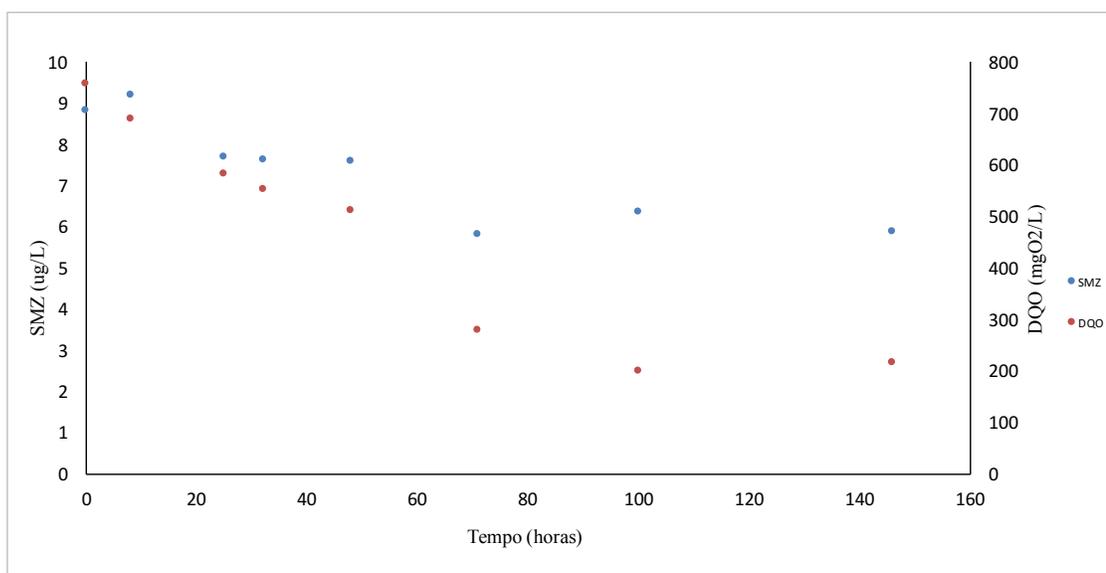


Figura 9 - Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO e SMZ ao longo da batelada 4

Em ambos experimentos é possível observar que houve degradação de sulfametazina e de matéria orgânica, entretanto é importante destacar que os dados apresentados foram obtidos por apenas uma das replicatas ensaiadas. Os resultados obtidos pelas duplicatas correspondentes não foram satisfatórios. O não funcionamento de uma das replicatas sugere a possibilidade de desestabilização do sistema.

Para descrever o comportamento do perfil temporal de degradação da DQO utilizou-se uma equação de decaimento exponencial com residual (Equação 5.2). Para o ajuste dos dados obtidos ao modelo utilizou-se o método de regressão linear dos Mínimos Quadrados.

$$C_{DQO}(t) = C_{res} + (C_{DQO}(0) - C_{res}) * e^{-k_{obs}.t}$$

(Equação 5.2)

Em que:

C_{DQO} = Demanda química de oxigênio ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$);

C_{res} = Demanda química de oxigênio residual ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$);

t = tempo (horas);

k_{obs} = Constante de velocidade de degradação observada da DQO (h^{-1}).

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam os perfis de DQO das batelas 2, 3 e 4 com as curvas ajustadas de acordo com a equação 5.2.

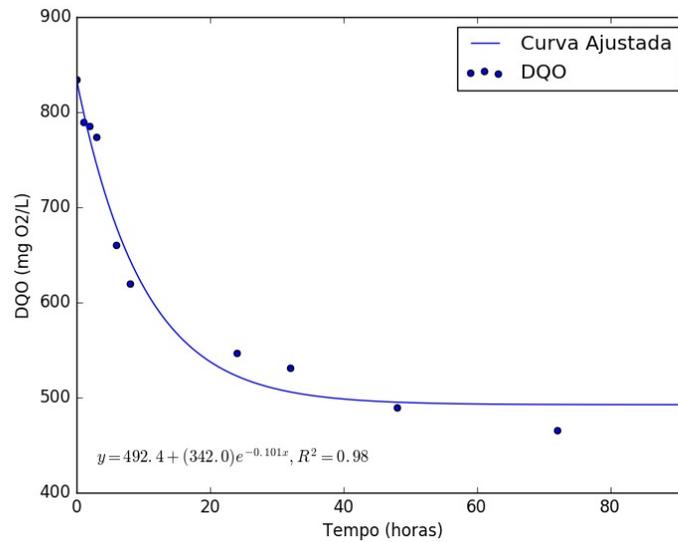


Figura 10 - Linha 1, Etapa 1: Ajuste do perfil temporal de DQO da Batelada 2

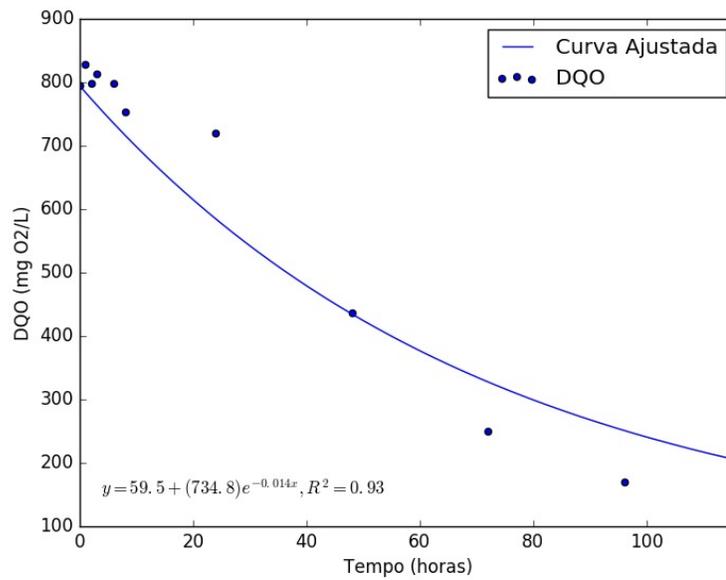


Figura 11 - Linha 1, Etapa 1: Ajuste do perfil temporal de DQO da Batelada 3

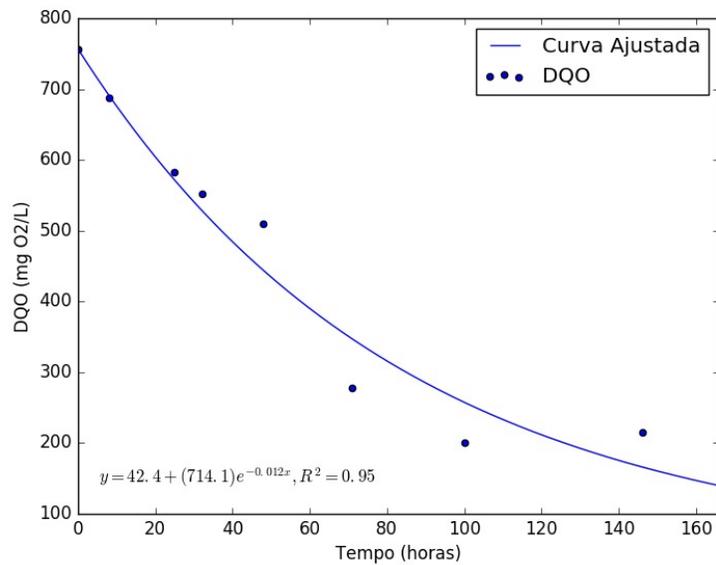


Figura 12 - Linha 1, Etapa 1: Ajuste do perfil temporal de DQO da Batelada 4

Na Tabela 5 estão apresentadas as variáveis obtidos pelo ajuste dos dados experimentais das bateladas 2, 3 e 4 à Equação 5.2

Tabela 5 - Parâmetros de ajuste dos dados experimentais

Velocidade Superficial (cm.min⁻¹)	k_{obs} (h⁻¹)	C_{res} (mg O₂.L⁻¹)	R²
0,6	0,101	492,4	0,98
1,32	0,014	59,5	0,93
3,24	0,012	42,4	0,95

Os R² obtidos para a Batelada 2 foi bom sugerindo que o modelo proposto apresentou um ajuste adequado aos dados obtidos, já para as Bateladas 3 e 4 os R² obtidos sugerem uma dispersão um pouco maior, mas o modelo apresenta um ajuste satisfatório dos dados experimentais.

Era esperado que um aumento na velocidade levasse a uma diminuição da resistência à transferência de massa, fato que seria verificado por um aumento das constantes de velocidade observadas (k_{obs}), até um valor limite, no qual seria observado a minimização da resistência à transferência externa de massa.

A comparação dos coeficientes calculados para as bateladas 2, 3 e 4 (0,101 h⁻¹, 0,014 h⁻¹ e 0,012 h⁻¹) mostra que ocorreu uma queda nos coeficientes de reação calculados, sugerindo que a condição de eliminação da resistência à transferência de massa não foi atingida. Tal fato é um indicio ainda mais forte do funcionamento instável do sistema.

Silva (2013) realizou experimentos com reatores diferenciais variando a velocidade intersticial, e observou que, a partir da velocidade 0,18 cm.min⁻¹, ocorre uma queda na velocidade global de reação, atribuída ao arraste da biomassa.

As velocidades testadas no presente trabalho são muito superiores a 0,18 cm.min⁻¹, logo é possível que tenha ocorrido desprendimento da biomassa, deixando o sistema instável.

Existe também a possibilidade de que o escoamento nos reatores diferenciais tenha sido inadequado, ou seja, não ocorreu uma distribuição uniforme do líquido pelo reator, resultando em uma redução do volume útil efetivo do reator e contribuindo para os resultados insatisfatórios. É possível que o reduzido comprimento do reator usado (5,1 cm) tenha inviabilizado a dispersão uniforme do líquido ao longo do reator. Um parâmetro importante para a eficiência de reatores anaeróbios de leito fixo é razão comprimento-diâmetro (ZAIAT et al., 1999). A razão

comprimento-diâmetro do reator diferencial é da ordem 2, valor baixo que pode ter interferido no funcionamento do reator.

Foram realizadas bateladas posteriores a essas, todas com velocidades superficiais superiores às aplicadas nas bateladas anteriores. Na Tabela 6 estão apresentadas as condições operacionais dos experimentos realizados.

Tabela 6 - Condições operacionais das bateladas 5, 6 e 7

Experimento	Velocidade superficial (cm.min⁻¹)	DQO inicial (mg O₂.L⁻¹)
Batelada 5	4,13	650±37
Batelada 6	4,13	405±5
Batelada 7	4,80	311±44

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13.

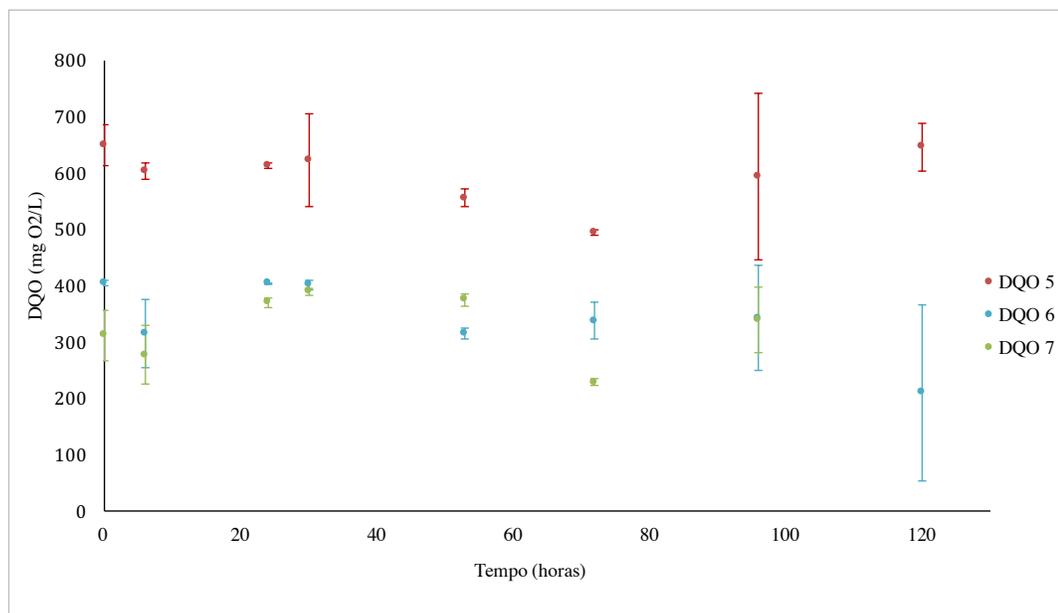


Figura 13 - Linha 1, Etapa 1: Perfis temporais de DQO nas bateladas 5,6 e 7

Observou-se que em nenhum dos experimentos ocorreu variação significativa na DQO ao longo dos experimentos, indicando a ineficiência do sistema testado e fortalecendo a hipótese de que as velocidades testadas são elevadas e promoveram o desprendimento da biomassa.

- Monitoramento da Concentração de Sólidos Suspensos Voláteis

Ao final das bateladas foram realizadas análises gravimétricas para quantificar a biomassa por meio da massa de sólidos suspensos voláteis presentes nos reatores. Extraiu-se a biomassa de todas as replicatas realizadas, e calculou-se a média dos valores obtidos em cada batelada. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados das análises de Sólidos

Experimento	SSVtotal (g)	SSV por massa seca
		de Espuma (g SSV.g espuma⁻¹)
2^a Batelada	0,354	1,37
3^a Batelada	0,391	1,54
4^a Batelada	0,507	2,03
5^a Batelada	0,451	1,79
6^a Batelada	0,348	1,36
7^a Batelada	0,294	1,15

O desvio padrão relativo calculado para a massa de sólidos suspensos voláteis entre todas as bateladas realizadas foi de 19,7%, indicando considerável variação da massa de SSV nos reatores ao final das bateladas. De maneira similar, se for avaliada a massa de SSV aderida à espuma, o desvio padrão relativo obtido corresponde a 20,7%. Considerando que os reatores foram inoculados com um mesmo número de matrizes de espumas, retiradas de um único reator, a variabilidade de SSV ao final dos experimentos sugere uma influência dos tratamentos experimentais aplicados. No entanto, não se verificou uma correlação entre as velocidades superficiais aplicadas e as massas de SSV remanescentes ao final das bateladas. Assim, é possível que a variação na quantidade de SSV aderida à espuma pode ter ocorrido devido a variabilidade da amostragem de espumas no reator inicial ou ao arraste de biomassa do reator.

A análise dos dados experimentais encontrados sugere que não foi possível obter a condição de eliminação da resistência a transferência de massa externa. Diante disso não foi possível evoluir

para as etapas seguintes do projeto com o intuito de determinar os parâmetros cinéticos da remoção de sulfametazina em águas residuárias de suinocultura.

Os possíveis motivos que impossibilitaram essa condição são: desprendimento da biomassa, hidrodinâmica ineficiente dos reatores diferenciais e o desbalanceamento do processo anaeróbio na biomassa aderida às espumas para uma condição apenas acidogênica, que não seria representativa do processo metanogênico estável que se desejava avaliar.

5.1.3. Linha 1, Etapa 2. Variação da Agitação da Mesa Agitadora

Ainda com intuito de determinar os parâmetros cinéticos intrínsecos optou-se pela utilização de outra metodologia, os reatores diferenciais foram substituídos por frascos de vidro mantidos em agitação constante, os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.1.3.1. Batelada com agitação de 60 rpm

A Figura 14 apresenta o gráfico com a variação temporal da DQO quando a mesa agitadora foi mantida a 60 rpm, a DQO inicial foi de $473 \pm 18 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

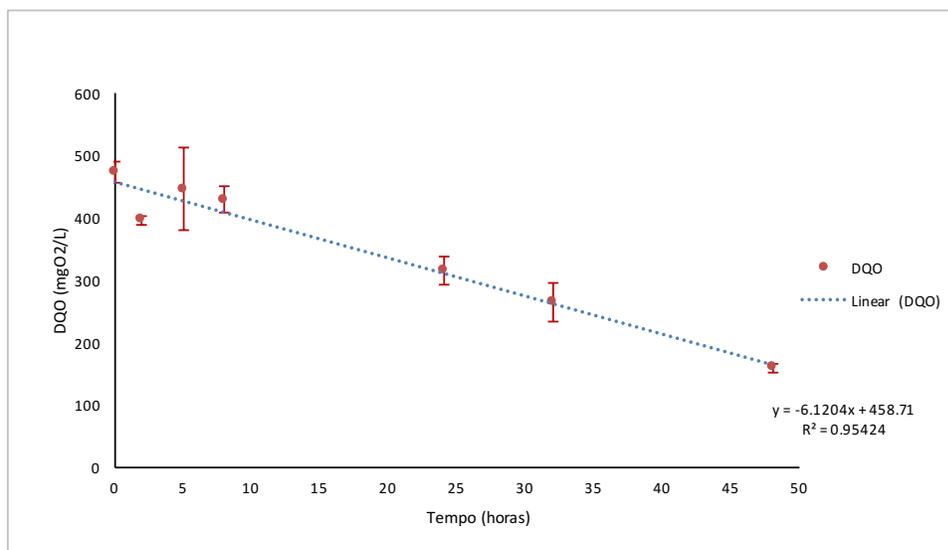


Figura 14 – Linha 1, Etapa2: Perfil Temporal da DQO com agitação de 60 rpm

Observa-se que houve uma remoção significativa da matéria orgânica presente no meio, cerca de 66,4% da DQO inicial foi removida ao final do ensaio. Os resultados se ajustam bem a uma reta, sugerindo que remoção de matéria orgânica segue uma cinética de ordem zero, resultado diferente dos resultados obtidos na Etapa 1 da Linha de Investigação 1 que sugeriram uma cinética com decaimento exponencial com residual.

Para descrever o comportamento do perfil temporal de degradação da DQO utilizou-se uma equação de decaimento linear

$$C_{DQO}(t) = K * t + C_{DQO(0)}$$

(Equação 5.3)

Em que:

C_{DQO} = Demanda química de oxigênio ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$);

t = tempo (horas);

K = Constante de velocidade de degradação da DQO ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

Então, de acordo a equação mostrada na Figura 14, tem-se que a equação que descreve de maneira adequada a remoção de SMZ é $C_{DQO}(t) = -6,1204 * t + 458,7$

5.1.3.2. Batelada com agitação de 90 rpm

A Figura 15 apresenta o gráfico com a variação temporal da DQO quando a mesa agitadora foi mantida a 90 rpm, a DQO inicial foi de $469 \pm 43 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

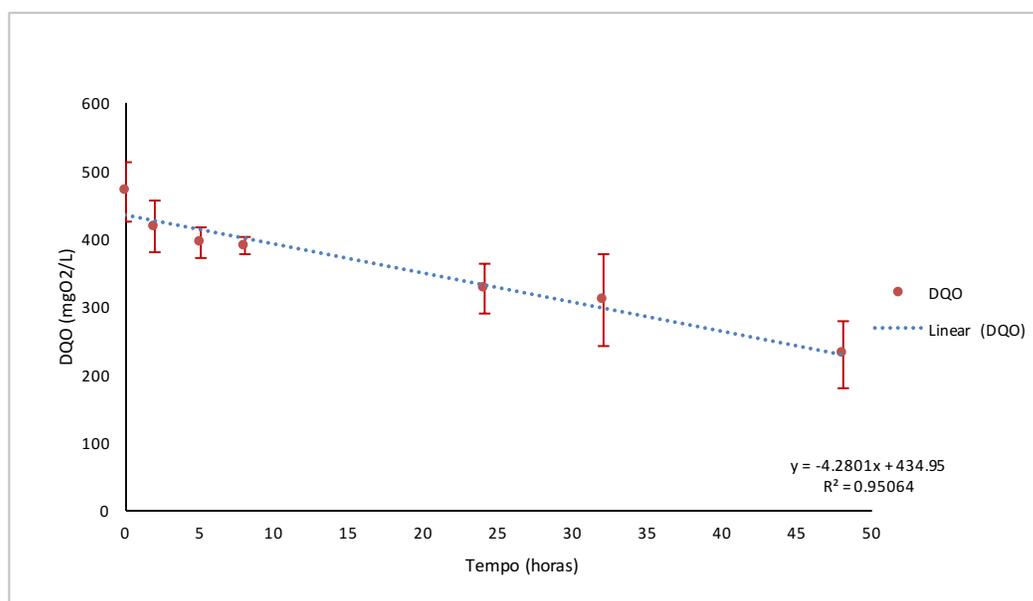


Figura 15 - Linha 1, Etapa2: Perfil temporal da DQO com agitação de 90 rpm

Observa-se que houve remoção de DQO ao longo da batelada de cerca de 51%, porém a porcentagem de remoção foi menor quando comparada com a batelada anterior. de acordo a

equação mostrada na figura, tem-se que a equação que descreve de maneira adequada a remoção de SMZ é $C_{DQO}(t) = -4,2801*t + 434,95$.

5.1.3.3. Batelada com agitação de 120 rpm

A Figura 16 contém o gráfico com a variação temporal da DQO quando a mesa agitadora foi mantida a 120 RPM, a DQO inicial foi de $423 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$.

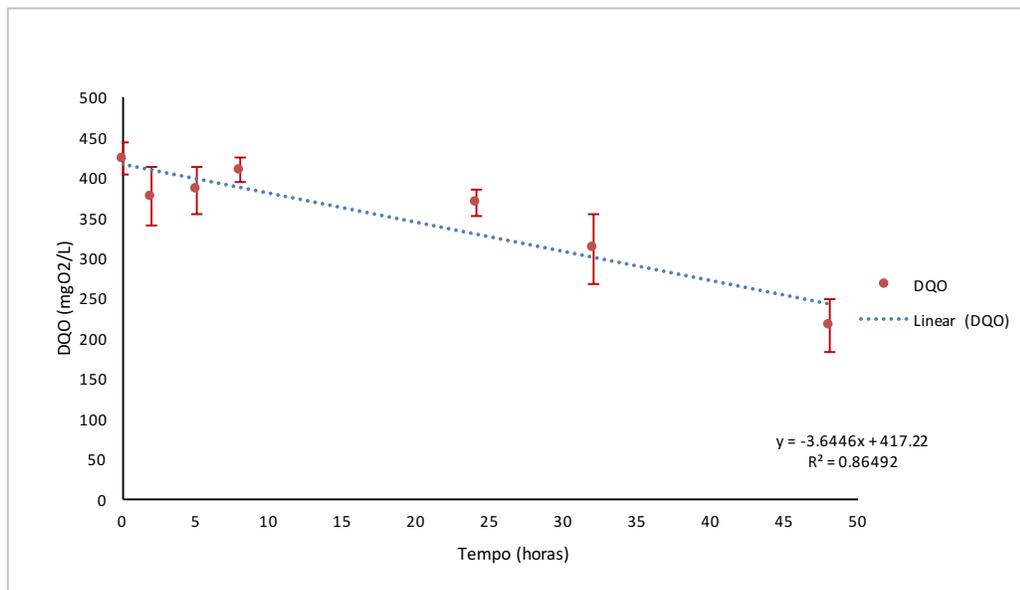


Figura 16 - Linha 1, Etapa2: Perfil temporal da DQO a uma agitação de 120 rpm

Observa-se que houve remoção de DQO ao longo da batelada da ordem de 49%, novamente observou-se que a porcentagem de remoção foi menor quando comparada com a batelada anterior. De acordo a equação mostrada na figura, tem-se que a equação que descreve de maneira adequada a remoção de SMZ é $C_{DQO}(t) = -3,6446*t + 417,22$.

Após esse experimento foram realizadas duas bateladas com uma agitação de 150 rpm, nas duas os resultados obtidos não foram satisfatórios. A remoção de DQO observada em ambas foi insignificante. Então optou-se por não apresentar esses resultados.

A comparação dos resultados obtidos nas bateladas indicou que um aumento na velocidade de agitação da mesa agitadora resultou em um decaimento na velocidade de remoção de DQO, as constantes de velocidade de degradação da matéria orgânica (como DQO) obtidas foram: 6,1204, 4,2801, 3,645 $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, para intensidades de agitação de 60 rpm, 90 rpm e 120 rpm, respectivamente. Além disso, houve uma redução na eficiência de remoção da DQO com o aumento da velocidade. Era esperado que houvesse um aumento na constante de velocidade de

degradação até o valor em que a resistência a transferência de massa externa fosse superada. Entretanto, esse aumento não ocorreu e não foi possível atingir a condição para superar a resistência à transferência de massa externa. É possível que esse resultado tenha ocorrido devido ao desprendimento de biomassa ocasionado pelo aumento da intensidade de agitação, causando uma redução na concentração de biomassa em cada ensaio, devido à maneira sequencial como foram conduzidas as bateladas.

- Monitoramento da Concentração de Sólidos Suspensos Voláteis

Ao início e ao final da Etapa 2 da Linha 1, foram realizadas análises gravimétricas para quantificar a biomassa por meio da massa de sólidos suspensos voláteis presentes nos frascos. Extraíu-se uma quantidade de biomassa de todas as replicatas realizadas, e calculou-se a média dos valores obtidos no início e no fim da Etapa 2. Os resultados obtidos estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Variação da concentração de SSV

Etapa	SSV total (g)
Inicial	1,599 ± 0,10
Final	0,612 ± 0,25

A comparação da massa de sólidos suspensos totais no início das bateladas sequenciais (1,599 g) com a massa após a realização dos experimentos (0,612 g) mostra uma redução da ordem de 62% na quantidade de sólidos. Essa redução pode ter ocorrido por arraste da biomassa devido ao aumento das velocidades testadas. Além disso, essa diminuição pode ter interferido nos resultados das constantes de velocidade obtidas.

Os resultados obtidos experimentalmente não permitem fazer afirmações sobre as condições nas quais as resistências a transferência de massa externa e interna são atingidas, talvez devido a problemas no funcionamento da biomassa. Diante disso não foi possível obter os dados necessários para atingir os objetivos propostos pelo trabalho e optou-se por fazer outra investigação a respeito da degradação de SMZ conforme já mencionado anteriormente.

5.2. Avaliação do Cometabolismo

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nas bateladas realizadas referente a Linha de Investigação 2, com a finalidade de avaliar a ocorrência de cometabolismo durante a degradação de SMZ.

5.2.1. *Linha 2 - Etapa 1. Variação dos compostos fornecedores de matéria orgânica*

A revisão bibliográfica realizada a respeito dos mecanismos de remoção de antibióticos em sistemas de tratamento de efluentes aponta para a possibilidade de que a biodegradação desses compostos ocorra por cometabolismo.

Levando em consideração que o cometabolismo decorre da inespecificidade de uma ou mais enzimas envolvidas nas diversas etapas da degradação das fontes de carbono que sustentam o crescimento microbiano, é possível que a degradação de sulfametazina esteja associada a um passo metabólico específico da degradação de algum dos constituintes do meio sintético. A identificação das rotas às quais está associada a degradação de SMZ é interessante para conseguir sistemas de tratamento mais eficientes. A biodegradação anaeróbia é um processo que decorre em etapas sequenciais (hidrólise, acidificação, acetogênese e metanogênese) e assim, é possível que a biodegradação de SMZ ocorra durante alguma etapa específica desse processo e esteja associada ao consumo de substratos primários ou de algum produto intermediário da biodegradação desses substratos.

Com intuito de analisar qual composto do meio sintético contribui efetivamente com a remoção de SMZ e em a qual etapa da degradação desse substrato ocorre a biodegradação de sulfametazina, foi realizada uma etapa experimental na qual cada constituinte do meio sintético forneceu, individualmente, toda a matéria orgânica presente no meio. Foram testados como fonte de carbono: amido, celulose, óleo de soja, sacarose, extrato de carne, glicose, frutose e etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico. Além disso, foram adicionados os constituintes inorgânicos do meio Bergmann et al. (2000) em todos os frascos para garantir a presença de nutrientes, a manutenção do pH, da capacidade de tamponamento e força iônica total.

Para a avaliação da adsorção, além realizar experimentos com os constituintes orgânicos do meio sintético separadamente, também foram testados frascos apenas com os componentes inorgânicos, biomassa e SMZ. Esses ensaios foram chamados de branco.

A quantificação da adsorção de SMZ a biomassa foi feita a partir do modelo proposto por Oliveira et al. (2016) que assume que, quando em equilíbrio, a adsorção de SMZ em lodo granular anaeróbio segue uma isoterma linear, de acordo com a Equação 5.4.

$$Kp = \frac{C_s^{eq}}{C_w^{eq} \cdot X}$$

(Equação 5.4)

Onde:

C_s^{eq} = concentração de SMZ adsorvida em termos da concentração em solução, no equilíbrio ($\mu\text{g. L}^{-1}$)

C_w^{eq} = concentração de SMZ na fase líquida no equilíbrio ($\mu\text{g. L}^{-1}$)

Kp = Coeficiente de partição (g STV.L^{-1})

X = Concentração de biomassa (L.g STV^{-1})

Optou-se por utilizar o Kp de $0,0717 \text{ L.g.STV}^{-1}$ obtido por Oliveira et al. (2016) que foi calculado utilizando diferentes concentrações iniciais de SMZ. Realizou-se a inativação prévia da biomassa, impedindo assim a ocorrência de biodegradação, e garantindo que a remoção de SMZ ocorresse por adsorção. Os autores também realizaram testes sem a inativação da biomassa e sem a adição de matéria orgânica ao meio, avaliando assim a contribuição da matéria orgânica endógena com a biodegradação de SMZ. Os resultados obtidos sugerem que a remoção de SMZ foi igual nos experimentos com biomassa inativada e nos experimentos sem a inativação prévia da biomassa. Portanto, a matéria orgânica endógena provavelmente não contribui com a biodegradação de SMZ.

Utilizando a Equação 5.4 foi possível calcular a quantidade de SMZ adsorvida durante os experimentos, enquanto o cálculo da concentração de SMZ removida por biodegradação foi feito de acordo com a equação 5.5.

$$C_{BD}^{eq} = C_{inicial} - C_w^{eq} - C_s^{eq}$$

(Equação 5.5)

Em que:

$$C_s^{eq} = \text{SMZ adsorvida } (\mu\text{g. L}^{-1})$$

$$C_w^{eq} = \text{SMZ na fase líquida ao final do ensaio (no equilíbrio)} (\mu\text{g. L}^{-1})$$

$$C_{BD}^{eq} = \text{SMZ removida por biodegradação } (\mu\text{g. L}^{-1})$$

$$C_{inicial} = \text{SMZ no início do experimento } (\mu\text{g. L}^{-1})$$

Aplicando as Equações 5.4 e 5.5 aos resultados obtidos experimentalmente, foi possível calcular as quantidades de SMZ removidas por adsorção e por biodegradação, respectivamente. Em seguida, construiu-se um gráfico de barras com a porcentagem de remoção de SMZ por adsorção, por biodegradação e a porcentagem de SMZ que permaneceu em solução aquosa. Esse gráfico é apresentado na Figura 16. Todos os gráficos e tabelas apresentados foram construídos utilizando os valores médios das quintuplicatas.

O ensaio realizado apresentou reprodutibilidade satisfatória, indicada pelos reduzidos desvios padrão obtidos para a medição de SMZ remanescentes nos frascos. O maior desvio padrão relativo foi de 14%, que foi observado para os frascos com etanol. Em todos os outros frascos foram observados valores abaixo de 10%, sugerindo que as porcentagens apresentadas no gráfico Figura 17, não carregam um erro significativo.

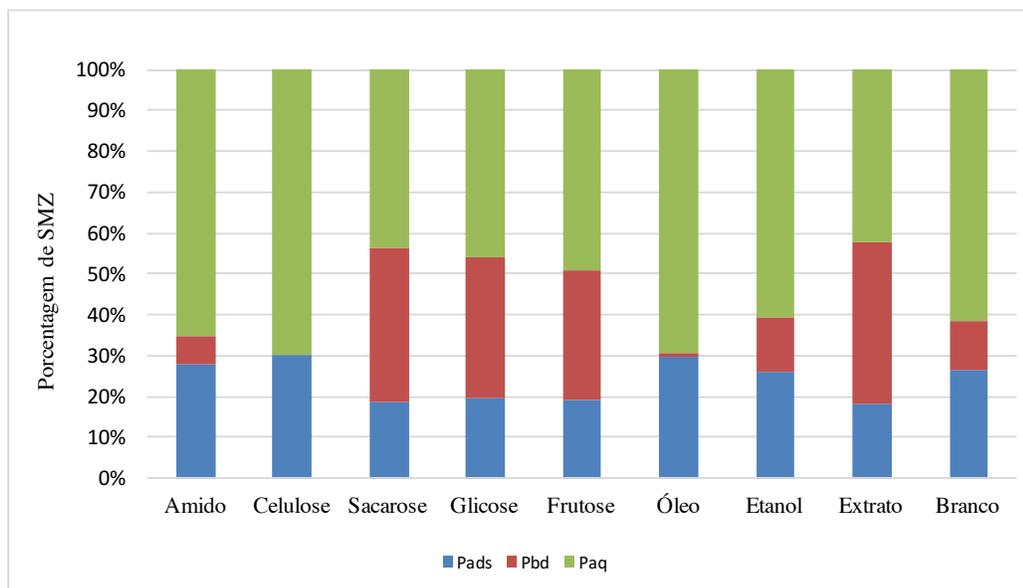


Figura 17 –Linha 2, Etapa 1: Porcentagens de SMZ removida por biodegradação e por adsorção

No qual:

P_{ads} é a porcentagem de SMZ removida por adsorção

P_{bd} é a porcentagem de SMZ removida por biodegradação

P_{aq} é a porcentagem de SMZ que permaneceu em solução aquosa

Analisando a Figura 17, observa-se que o mecanismo de remoção de sulfametazina predominante para sacarose, glicose, frutose e extrato de carne foi a biodegradação, enquanto que para amido, óleo, celulose, etanol e branco a adsorção foi predominante.

Era esperado que toda a remoção de SMZ observada no branco fosse decorrente de adsorção, uma vez que não havia matéria orgânica disponível no meio possibilitando a biodegradação de SMZ por cometabolismo, e, estudos anteriores demonstraram que a matéria orgânica endógena não contribui significativamente com a biodegradação de SMZ (Oliveira et al., 2016). Entretanto, os resultados obtidos sugerem a ocorrência de biodegradação no branco. Acredita-se que esse resultado seja um erro decorrente do K_p utilizado. Então é possível que a porcentagem de adsorção mostrada no gráfico esteja subestimada.

Além disso, a porcentagem de remoção por biodegradação observada para a celulose foi nula ou muito baixa. O valor obtido através dos cálculos foi negativo e optou-se por substituí-lo por zero. O valor negativo encontrado talvez seja decorrente de um erro do K_p utilizado. Esse resultado fortalece a hipótese de que o K_p utilizado pode acarretar em erros.

A Tabela 9 contém as porcentagens de remoção total de sulfametazina, calculadas a partir dos valores médios das quintuplicatas.

Tabela 9 - Eficiência de remoção de SMZ Durante a Etapa 1 da Linha 2

Composto	Remoção de SMZ (%)
Amido	35 ± 6
Celulose	24 ± 5
Sacarose	58 ± 6
Glicose	54 ± 6
Frutose	53 ± 10
Etanol	39 ± 14
Extrato de Carne	57 ± 5
Óleo	31 ± 5
Branco	38 ± 3

Observa-se que nos frascos com sacarose, glicose, frutose e extrato de carne as remoções de SMZ foram significativamente maiores que nos demais frascos. Aplicou-se o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney U-test (com $\alpha = 0,05$) para verificar as diferenças entre as porcentagens de remoção total. A partir desse teste verificou-se que a remoção de SMZ observada no experimento com amido não apresenta diferença estatisticamente relevante da remoção observada no branco, mesmo resultado obtido para o etanol. Já para os experimentos com celulose, óleo, sacarose, frutose, glicose e extrato de carne o resultado do teste indica que há diferença estatística de remoção de SMZ, quando comparados ao branco. Além disso, verificou-se que não há diferença estatisticamente relevante entre os percentuais de remoção de SMZ observados para a frutose e a glicose. Portanto, pode-se afirmar que nos experimentos com extrato de carne, sacarose, glicose e frutose a remoção de SMZ foi significativamente maior que a remoção observada no branco, sugerindo que nesses frascos houve remoção de SMZ por biodegradação.

Os valores de remoção percentual média de DQO são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Remoção percentual de DQO para diferentes fontes de matéria orgânica

Composto	Remoção de DQO (%)
Amido	89 ± 11
Celulose	92 ± 9
Sacarose	74 ± 8
Glicose	78 ± 7
Frutose	75 ± 13
Etanol	82 ± 23
Extrato de Carne	73 ± 6
Óleo	65 ± 17

A observação conjunta dos dados de remoção de DQO e SMZ sugere que alguns constituintes do meio sintético não têm papel importante na biodegradação da SMZ. Uma vez que, para os experimentos com amido, celulose, óleo e etanol, mesmo havendo remoção de matéria orgânica significativa (todos apresentaram remoções de DQO acima dos 65%), não houve remoção significativa de SMZ por biodegradação (os valores de remoção de SMZ observados para esses três compostos podem ser quase totalmente atribuídos à adsorção).

Portanto, os resultados sugerem que extrato de carne, sacarose, glicose e frutose são substâncias que contribuem efetivamente com a biodegradação de sulfametazina. É possível que esse processo ocorra por cometabolismo durante alguma das etapas de degradação desses compostos.

Oliveira (2016) realizou experimentos com o intuito de avaliar a influência do cometabolismo na biodegradação de SMZ, para isso observou o perfil temporal de remoção de SMZ e matéria orgânica durante 72 horas e, após observar a estabilização dos dois perfis, adicionou sacarose sólida ao meio reacional (meio reacional composto de água residuária sintética de suinocultura, lodo

anaeróbio e SMZ). A adição de sacarose contribui para que houvesse um aumento na remoção de SMZ, que já estava estabilizada. Esse resultado fortalece a hipótese de que a biodegradação de SMZ pode estar associada a alguma etapa da biodegradação anaeróbia da sacarose.

A Figura 18 apresenta um esquema simplificado das rotas metabólicas de degradação anaeróbia de carboidratos (sacarose) e proteínas (extrato de carne).

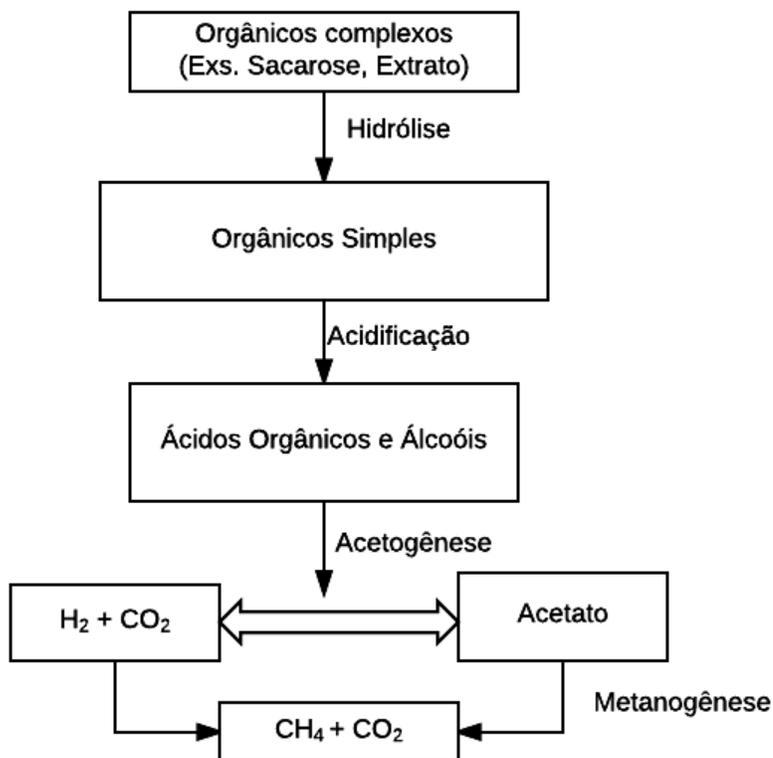


Figura 18 - Esquema simplificado da degradação anaeróbia de proteínas e carboidratos

Como pode ser observado na Figura 18, compostos orgânicos simples são produzidos durante a biodegradação anaeróbia de carboidratos orgânicos. Após a hidrólise da sacarose, por exemplo, os compostos produzidos são a glicose e a frutose. O fato de não haver diferença estatística entre a porcentagem de remoção de SMZ nos experimentos com sacarose, frutose e glicose sugere que a etapa metabólica de hidrólise da sacarose para formação de glicose e frutose não está envolvida na biodegradação de sulfametazina.

Para avaliar a influência das etapas posteriores, realizaram-se experimentos testando três ácidos orgânicos como fonte de matéria orgânica, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico, representativos dos ácidos produzidos durante a acidogênese de glicose e frutose por culturas microbianas mistas. As condições experimentais foram iguais às condições do experimento

anterior. As porcentagens de remoção por adsorção, por biodegradação e em solução aquosa foram calculadas como no experimento anterior e são mostradas no gráfico de barras da Figura 19.

Os desvios padrões da concentração final de SMZ observados foram os seguintes: 15% para o ácido propiônico, 3% para o ácido butírico e 2% para o ácido acético. Porcentagens relativamente baixas que sugerem um erro pequeno nos valores mostrados na Figura 19.

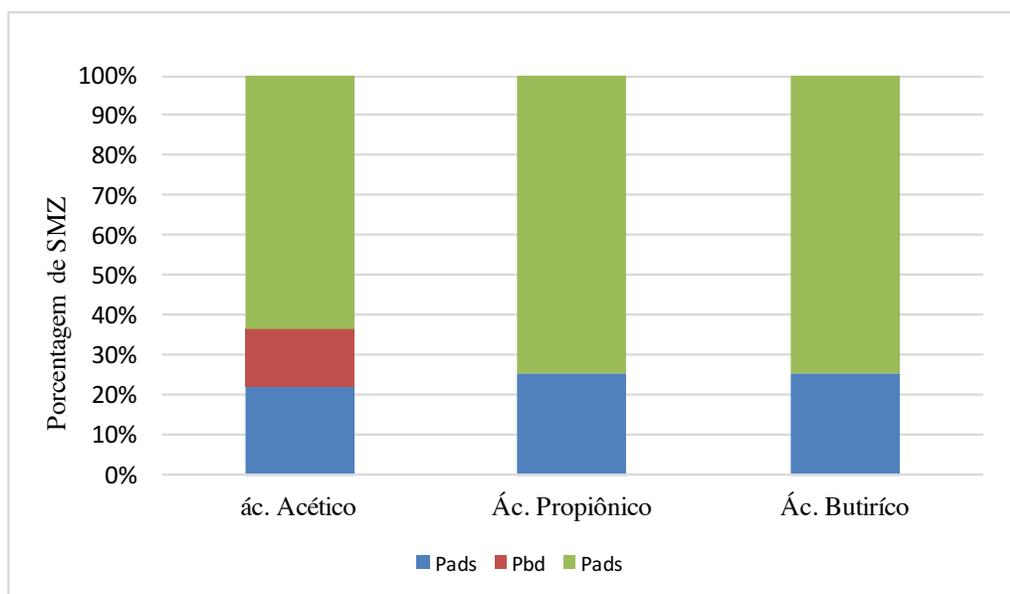


Figura 19 - Porcentagens de remoção de SMZ removida por Biodegradação e por Adsorção

O mecanismo de remoção predominante exibido pelo gráfico é a adsorção. Nos frascos com ácido propiônico e ácido butírico a porcentagem de biodegradação obtida por meio dos cálculos foi negativa, sugerindo que a biodegradação de sulfametazina nesses frascos foi irrelevante e optou-se por substituí-las por zero no gráfico. Já nos frascos com ácido acético observou-se a ocorrência de biodegradação, porém a porcentagem foi baixa (14%). Esse resultado sugere que a biodegradação de sulfametazina não ocorre em etapas metabólicas da degradação desses ácidos. É, portanto, pouco provável que a biodegradação de SMZ esteja associada às etapas posteriores à acidogênese, tais como a acetogênese e a metanogênese. É importante ressaltar, contudo, que não é possível eliminar por completo a possibilidade de ocorrência de degradação de SMZ associada às reações acetogênicas, uma vez que foram testados apenas alguns ácidos orgânicos.

Vale ressaltar que nesses experimentos os consumos de DQO observados foram significativos, sendo estes $88 \pm 2\%$, $75 \pm 8\%$ e $89 \pm 7\%$ para os frascos com ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico, respectivamente. Esses resultados sugerem que os ácidos foram consumidos pelos microrganismos, entretanto não contribuem com a biodegradação de SMZ

Levando em consideração a degradação da sacarose, os resultados sugerem que a etapa metabólica com maior possibilidade de ocorrência de biodegradação de sulfametazina é a acidogênese.

Resultados semelhantes foram observados por González-Gil et al. (2015). Os autores realizaram estudos para investigar a influência das etapas de hidrólise-acidogênese e metanogênese durante a digestão anaeróbia de 16 micropoluentes orgânicos, entre eles o antimicrobiano sulfametoxazol. Os resultados obtidos sugerem que biodegradação de SMX ocorre principalmente durante a hidrólise-acidogênese.

5.2.2. Linha 2 - Etapa 2. Variação da DQO inicial

Após estabelecer que sacarose e extrato de carne são constituintes do meio sintético com alto potencial de contribuição com biodegradação de SMZ foram feitos experimentos variando a quantidade de matéria orgânica inicial disponível ao início do experimento.

Primeiramente, utilizou-se o extrato de carne como fonte única de matéria orgânica. Foram testadas DQOs iniciais de, aproximadamente, 500 mg O₂.L⁻¹, 1500 mg O₂.L⁻¹, 2000 mg O₂.L⁻¹, 2500 mg O₂.L⁻¹. A partir da aplicação das Equações 5.3 e 5.4 foi possível construir o gráfico de barras com as porcentagens de SMZ removida por adsorção, por biodegradação e a que permaneceu em solução aquosa. Foram utilizados os valores médios das quintuplicatas para a construção do gráfico, que é mostrado na Figura 20.

Os desvios padrões da concentração final de SMZ observados foram, em geral, baixos. Com valores de 3%, para DQO inicial de 500 mg O₂.L⁻¹; 3% para DQO de 1500 O₂.L⁻¹; 10% para DQO de 2000 O₂.L⁻¹; 24% para DQO de 2500 O₂.L⁻¹. Essas porcentagens relativamente baixas que sugerem um erro pequeno nos valores apresentados na Figura 20.

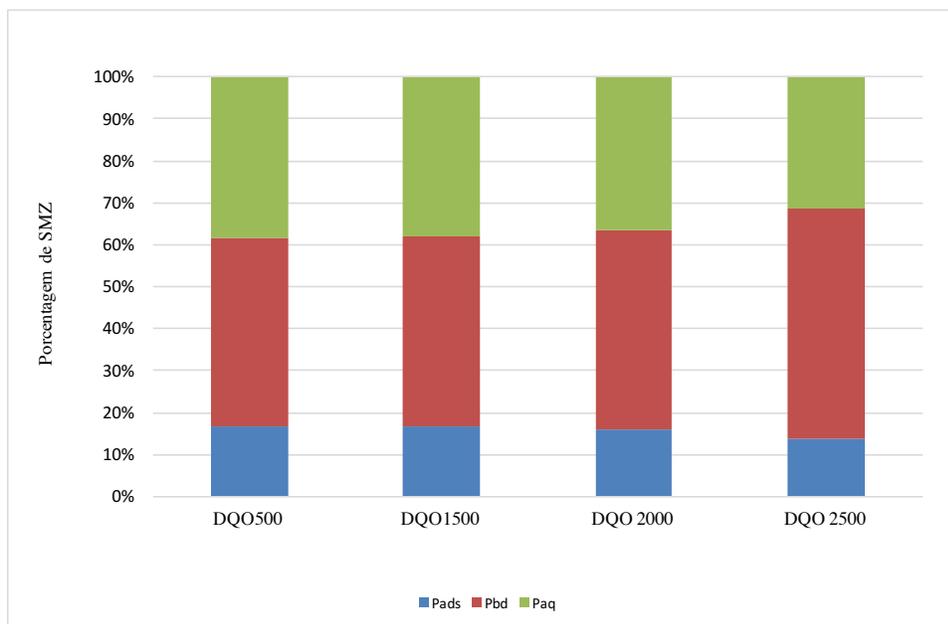


Figura 20 – Linha 2, Etapa 2 utilizando extrato de carne: Porcentagens de remoção de SMZ removida por Biodegradação e por Adsorção

Como é possível observar pela análise da Figura 20, a biodegradação é o mecanismo de remoção predominante. Oliveira et al. (2016) também aponta para a biodegradação como principal mecanismo de remoção da SMZ.

Resultados semelhantes foram observados por Cetecioglu et al. (2015) que avaliaram a remoção de sulfametoxazol presente em águas residuárias de indústria farmacêuticas, também em condições anaeróbias, e sugerem que a biodegradação é o principal mecanismo de remoção desse antimicrobiano, quando em concentrações de até 40 mg.L⁻¹.

Além disso, quando a quantidade de matéria orgânica disponível no meio aumenta, a porcentagem de remoção da SMZ por biodegradação também cresce. Com uma DQO inicial de 506,6 mg O₂.L⁻¹ a porcentagem de sulfametazina biodegradada foi de 44,8% e com DQO inicial média de 2469 mg O₂.L⁻¹ a porcentagem biodegradada subiu para 54,6%.

A aplicação do teste estatístico de Mann-Whitney U-test para verificar as diferenças entre as porcentagens de biodegradação de SMZ (com $\alpha = 0,05$) indicou a existência de diferença estatística entre os frascos com DQO inicial de 500 mg O₂.L⁻¹ e 2500 mg O₂.L⁻¹ e entre os com 1000 mg O₂.L⁻¹ e 2500 mg O₂.L⁻¹, ou seja, a biodegradação observada nos frascos com 2500 mg O₂.L⁻¹ é maior que as observadas nos frascos com 500 mg O₂.L⁻¹ e 1000 mg O₂.L⁻¹. Não há diferença estatística entre as biodegradações observadas nos outros frascos. Esse resultado confirma que o aumento na quantidade de matéria orgânica disponível contribui para uma maior remoção de SMZ.

Com o intuito de observar a relação entre a remoção de matéria orgânica e biodegradação de SMZ construiu-se um gráfico com a quantidade de SMZ removida por biodegradação em função da DQO removida, apresentado na Figura 21. As barras de erro na vertical e na horizontal correspondem a um desvio padrão das quintuplicatas.

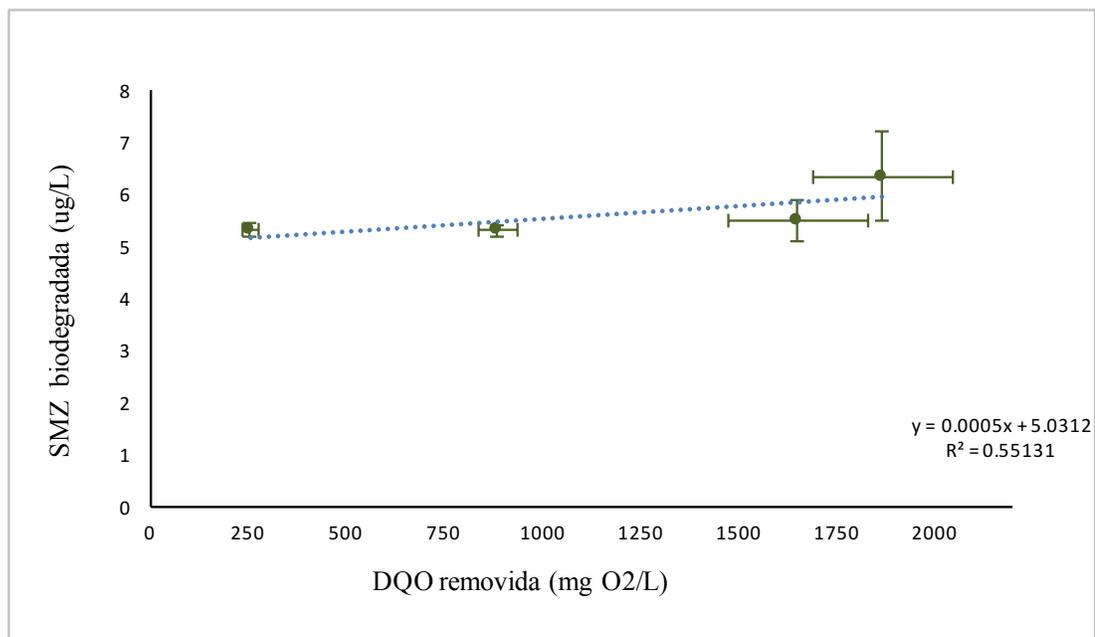


Figura 21 - Linha 2, Etapa 2 utilizando extrato de carne: Relação entre SMZ biodegradada e matéria orgânica removida

A observação da Figura 21 sugere que um aumento da remoção de matéria orgânica acentua biodegradação de SMZ. A regressão linear dos dados apresenta um coeficiente angular positivo ($0,0005 \mu\text{g SMZ} \cdot \text{mg O}_2^{-1}$), que corrobora essa afirmação. Entretanto, o valor desse coeficiente é muito baixo, sugerindo que a adição de extrato de carne como fonte única de matéria orgânica não é uma forma eficiente de otimizar a biodegradação de SMZ.

Além disso, o ajuste dos dados a equação mostrada na Figura 21 apresenta um R^2 muito baixo sugerindo que a equação proposta não representa adequadamente a relação entre SMZ biodegradada e DQO removida.

A existência de diferença estatística somente entre as quantidades de SMZ biodegradada nos frascos com DQO inicial de $500 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e $2500 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e o baixo coeficiente angular mencionado acima apontam para uma necessidade de adição de grandes quantidades de extrato de carne para que haja um aumento significativo na biodegradação de SMZ.

Repetiu-se o experimento variando as quantidades iniciais de matéria orgânica presente no meio utilizando-se a sacarose como fonte de matéria orgânica. As DQOs iniciais testadas foram

de, aproximadamente, 500 mg O₂.L⁻¹, 1500 mg O₂.L⁻¹, 2000 mg O₂.L⁻¹, 2500 mg O₂.L⁻¹. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 22.

Os desvios padrões da concentração final de SMZ observados foram, em geral, baixos. Com valores de 2%, para DQO inicial de 500 mg O₂.L⁻¹; 13% para DQO de 1500 O₂.L⁻¹; 3% para DQO de 2000 O₂.L⁻¹ e 6% para DQO de 2500 O₂.L⁻¹. Essas porcentagens são relativamente baixas e sugerem um erro pequeno nos valores mostrados na Figura 22.

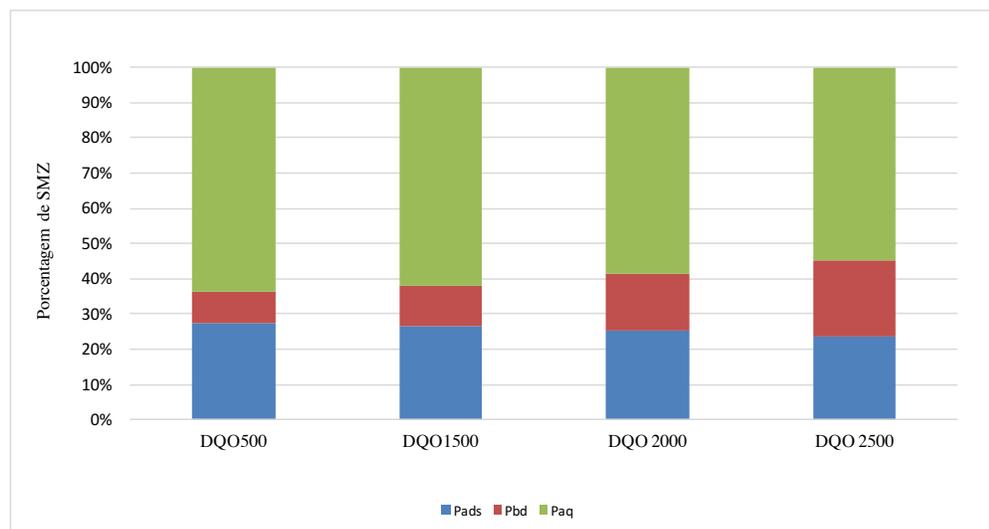


Figura 22 - Linha 2, Etapa 2 utilizando sacarose: Porcentagens de SMZ removida por biodegradação e por adsorção

Novamente, observa-se que uma maior quantidade de matéria orgânica disponível é acompanhada por aumento da porcentagem de biodegradação de SMZ. Nos frascos com DQO inicial média de 535,6 mg O₂.L⁻¹, a porcentagem de biodegradação observada foi de 9,2%, enquanto que o aumento da DQO inicial para 2528 mg O₂.L⁻¹ resultou em 21,5% de SMZ biodegradada.

Para avaliar se o aumento observado na biodegradação foi significativo, aplicou-se o teste de Mann-Whitney U-test. Os resultados obtidos apontam para a existência de diferença estatística entre os frascos com DQO inicial de 500 mg O₂.L⁻¹ e 2000 mg O₂.L⁻¹, 500 mg O₂.L⁻¹ e 2500 mg O₂.L⁻¹ e 2000 mg O₂.L⁻¹ e 2500 mg O₂.L⁻¹, ou seja, a biodegradação de SMZ nos frascos com 2000 mg O₂.L⁻¹ e 2500 mg O₂.L⁻¹ foi maior que no frasco com 500 mg O₂.L⁻¹ e a biodegradação no frasco com 2500 mg O₂.L⁻¹ foi maior que no frasco com 2000 mg O₂.L⁻¹. Não há diferença estatística entre as biodegradações nos demais frascos.

Com o intuito de observar a relação entre os aumentos na remoção de matéria orgânica e biodegradação de SMZ construiu-se o gráfico mostrado Figura 23.

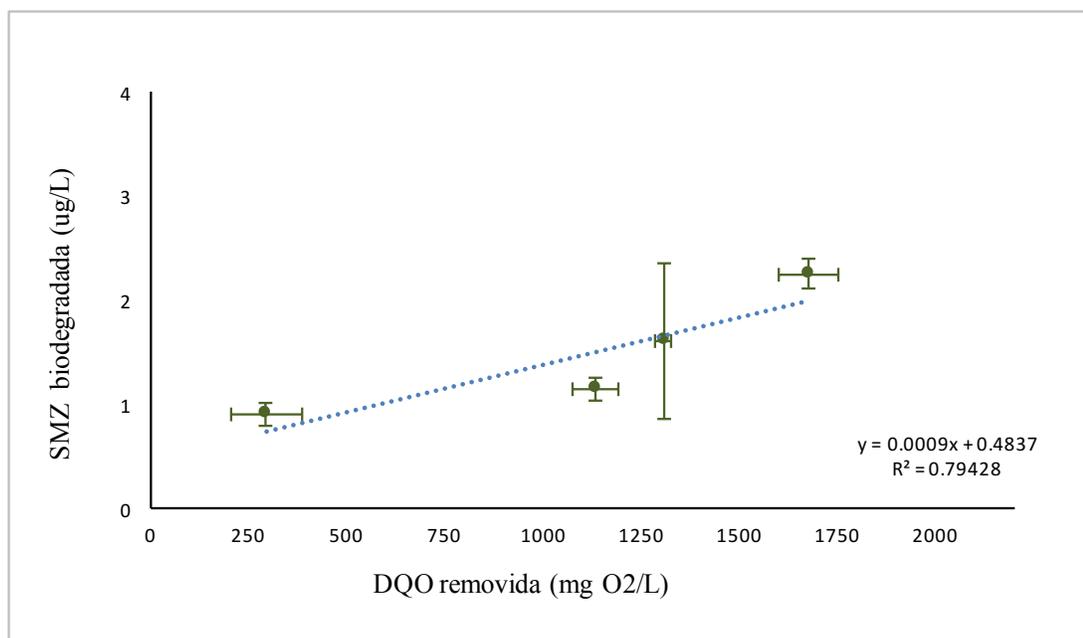


Figura 23 - Linha 2, Etapa 2 utilizando sacarose: Relação entre SMZ biodegradada e matéria orgânica removida

A análise do gráfico, novamente, sugere a hipótese de que há uma relação entre os aumentos de remoção de matéria orgânica e de biodegradação de SMZ. O coeficiente linear obtido através da regressão linear dos dados é positivo e maior que o observado para o experimento com extrato de carne ($0,0009 \mu\text{g SMZ} \cdot \text{mg O}_2^{-1}$). Porém, o valor observado ainda é baixo.

A equação de ajuste linear obtida e mostrada na Figura 23 apresenta um R^2 baixo (0,79), embora maior que o obtido no experimento anterior, sugerindo um ajuste melhor.

A comparação dos dados obtidos para os experimentos com sacarose e com extrato de carne sugere que a adição de sacarose como fonte única de matéria orgânica contribui de maneira mais acentuada com o aumento da eficiência de remoção de SMZ do que a adição de extrato. Apesar de ser melhor que o extrato, a adição de sacarose por si só não parece ser uma forma muito eficiente de otimizar as eficiências de remoção de SMZ.

Diferentemente dos experimentos com extrato de carne, o mecanismo predominante de remoção foi a adsorção. Tal resultado também é diferente dos resultados obtidos na Etapa 1, que apontam a biodegradação como mecanismo de remoção predominante. Além disso, as porcentagens de remoção total de SMZ obtidos nessa etapa são significativamente menores que os resultados obtidos na Etapa 1. Essas diferenças podem ter ocorrido devido a diferenças na

quantidade de biomassa ou diferenças nas características da biomassa utilizada em cada experimento. Antes da realização dos experimentos com sacarose na Etapa 2 observou-se que a biomassa não estava completamente submersa em líquido e apresentava coloração diferente da observada antes dos experimentos da Etapa 1.

Os resultados observados nessa etapa fortalecem a hipótese de que a biodegradação de sulfametazina ocorra por cometabolismo, uma vez que o aumento da eficiência de remoção desse antimicrobiano parece estar relacionado à quantidade de matéria orgânica disponível no meio e à sua remoção, ou seja, as remoções de SMZ e de matéria orgânica parecem estar relacionadas.

Braun et al. (2015) justificam a ocorrência de cometabolismo durante a biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (um micropoluente orgânico) de maneira similar. Os autores utilizam a correlação positiva entre as eficiências de remoção de matéria seca e desse micropoluente como indicio da ocorrência de cometabolismo.

A hipótese de que a biodegradação de antibióticos ocorre por meio de cometabolismo foi levantada anteriormente por Tran et al. (2009) e Oliveira et al. (2016). Mais especificamente, Oliveira et al. (2016) observaram que a biodegradação de SMZ depende da presença de matéria orgânica disponível no meio, sugerindo a ocorrência de cometabolismo.

A ocorrência de cometabolismo em sistemas de tratamento aeróbios foi estudada por Ottmar et al. (2012) que observaram a ocorrência de cometabolismo na biodegradação dos produtos farmacêuticos sinvastatina e atorvastatina em sistemas aeróbios. Kassotaki et al. (2016) sugerem que a biodegradação de SMX em sistemas aeróbios ocorre por cometabolismo e pode ser relacionada a taxa de nitrificação. Os autores observaram um aumento a eficiência de remoção desse antimicrobiano sob altas taxas específicas de oxidação de amônia.

5.2.3. Linha 2 – Etapa 3. Perfil temporal de degradação de SMZ e DQO

A última etapa experimental foi realizada com o intuito de avaliar os ácidos graxos voláteis produzidos e o perfil temporal de remoção de SMZ durante 72 horas, mesmo tempo de duração das etapas anteriores.

Primeiramente utilizou-se o extrato de carne como fonte de matéria orgânica, os resultados obtidos permitiram a obtenção do perfil temporal de degradação da SMZ e DQO que esta apresentado na Figura 24.

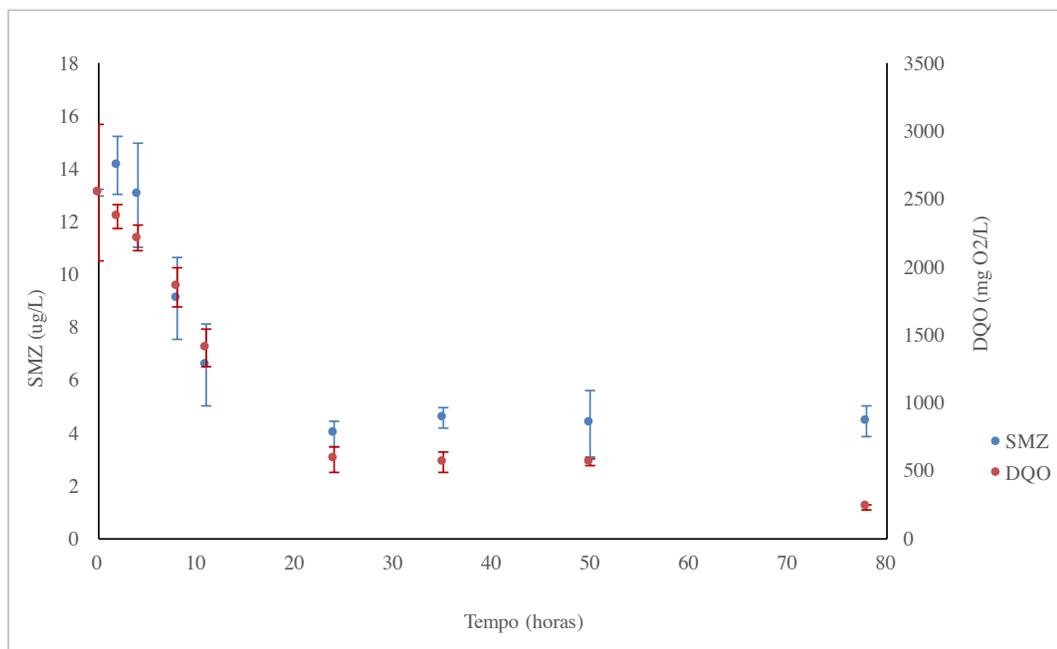


Figura 24 – Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal da SMZ e DQO com extrato como fonte de matéria orgânica

A remoção de DQO alcançada foi de 91%, já a remoção de SMZ foi da ordem de 66%. A observação do perfil sugere que a variação temporal de SMZ e de DQO ocorrem simultaneamente, fortalecendo a hipótese de que a remoção de SMZ está relacionada a remoção de matéria orgânica e ocorre por cometabolismo.

O perfil temporal obtido sugere que o tempo de reação adotado para todas as bateladas é adequado pois é suficiente para o estabelecimento do equilíbrio para a concentração de SMZ em solução aquosa. Após 24 horas de reação não ocorreram variações significativas na concentração de SMZ e na DQO.

As Figuras 25 e 26 apresentam os perfis temporais de ácido propiônico e ácido acético, respectivamente. Optou-se por apresentar apenas os perfis desses ácidos porque ambos apresentaram resultados consistentes e porque são compostos comumente produzidos durante a biodegradação anaeróbia de proteínas e carboidratos.

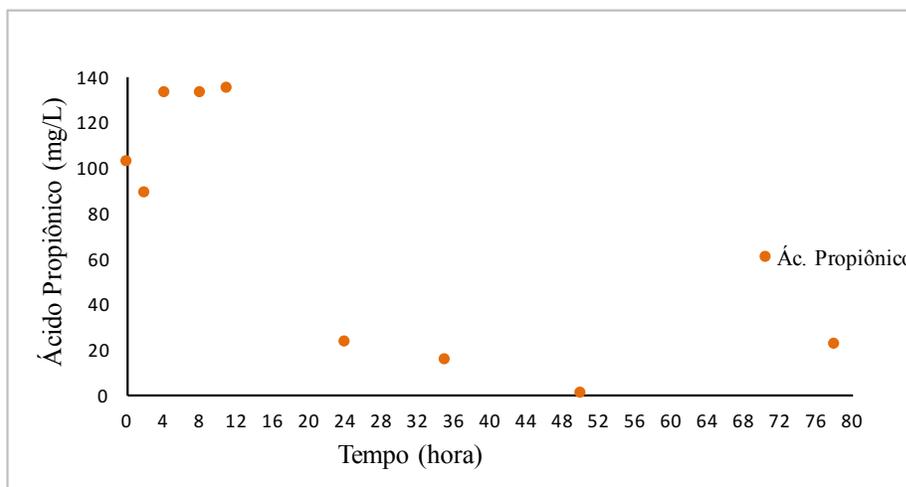


Figura 25 - Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido propiônico com extrato como fonte de matéria orgânica

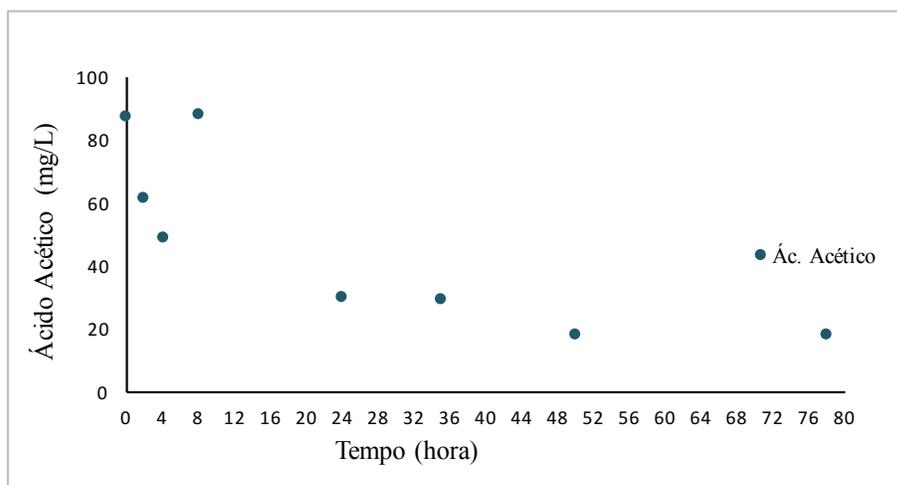


Figura 26 - Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido acético com extrato como fonte de matéria orgânica

A concentração dos ácidos acético e propiônico parece se estabilizar após 24 horas de reação. Além disso, para ambos os ácidos é possível observar um pico de concentração. Para o ácido propiônico isso ocorre entre 6 e 12 horas de reação e para o ácido acético o pico de concentração é observado após 8 horas de reação. Foi observado consumo dos ácidos orgânicos após o pico de concentração.

A comparação dos perfis dos ácidos com os perfis de DQO e SMZ não permite estabelecer uma relação clara entre a produção e o consumo de ácidos orgânicos e biodegradação de SMZ, não sendo possível associar a biodegradação de SMZ a uma etapa específica da biodegradação anaeróbia.

Posteriormente, a sacarose foi utilizada como fonte de matéria orgânica, os resultados obtidos permitiram a obtenção do perfil temporal de degradação da SMZ e DQO que é apresentado na Figura 27.

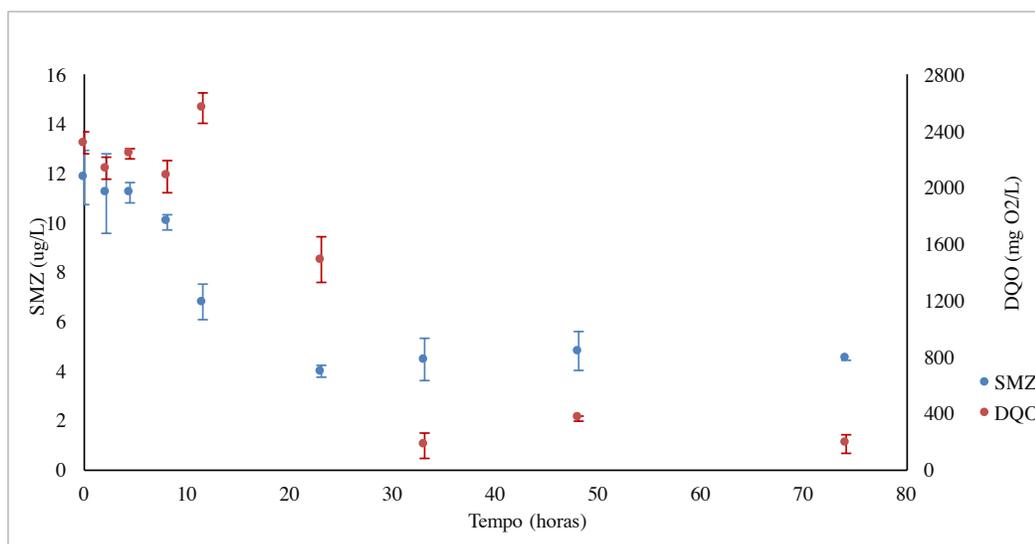


Figura 27 - Linha 2, Etapa 3: Perfis temporais da SMZ e DQO com sacarose como fonte de matéria orgânica

O perfil temporal obtido sugere que a remoção de SMZ e matéria orgânica ocorrem nas primeiras 36 horas de reação, depois disso não foram observadas variações significativas para DQO e para concentração de SMZ. Assim como no experimento anterior, as variações nos perfis de SMZ e DQO parecem ocorrer simultaneamente.

As eficiências de remoção de DQO e SMZ obtidas no experimento foram de 92% e 62% respectivamente. A remoção de SMZ atingida nessa etapa foi semelhante a eficiência de remoção obtida na Etapa 1 (58%), entretanto ambas foram significativamente superiores as remoções observadas na Etapa 2, que variaram entre 37% e 45%. Atribuiu-se essa diferença às condições da biomassa utilizada que foram diferentes na Etapa 2 (os grânulos não estavam completamente submersos antes do início do experimento e isso talvez tenha comprometido a capacidade de degradação da biomassa).

As Figuras 28 e 29 apresentam os perfis temporais de ácido propiônico e ácido acético, respectivamente, para os frascos com sacarose como fonte de matéria orgânica.

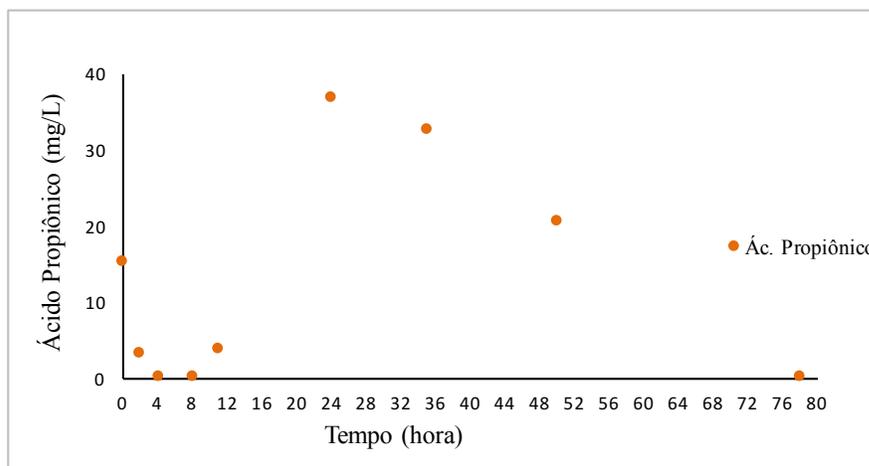


Figura 28 - Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido propiônico com sacarose como fonte de matéria orgânica

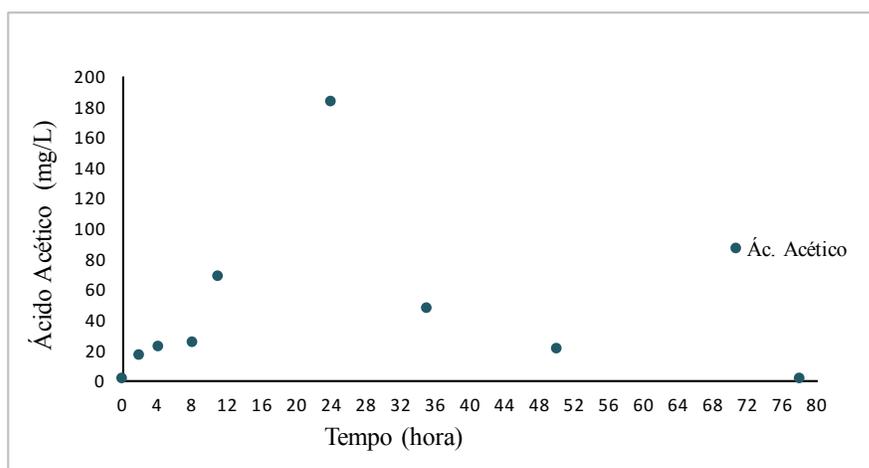


Figura 29 - Linha 2, Etapa 3: Perfil temporal do ácido acético com sacarose como fonte de matéria orgânica

A observação dos perfis de ácidos propiônico e acético evidencia a ocorrência de um pico de concentração de ambos às 24 horas. Esses perfis sugerem que a acidogênese ocorre predominantemente entre as 8 e as 24 horas de reação e que as etapas de acetogênese e metanogênese ocorrem após as 24 horas.

Após 24 horas de reação não foram observadas alterações significativas na concentração de SMZ, ou seja, é mais provável que a biodegradação de SMZ esteja associada à acidogênese.

Além disso, as maiores quedas na concentração de SMZ ocorreram entre 8 e 12 horas de reação e entre 12 e 24 horas de reação, em ambos intervalos de tempo ocorre aumento nas concentrações de ácidos propiônico e acético, ou seja, é possível que durante esse intervalo de tempo tenha ocorrido a acidogênese e que a biodegradação de SMZ esteja associada a esse passo metabólico.

Os resultados obtidos durante essa etapa fortalecem a hipótese de que as remoções de SMZ e matéria orgânica estão relacionadas e, portanto, a biodegradação de SMZ deve ocorrer por cometabolismo.

Além disso, os perfis temporais de ácidos do experimento com sacarose sugerem que a biodegradação de SMZ não deve estar associada às etapas acetogênicas e metanogênicas da digestão anaeróbica, embora o mesmo resultado não tenha sido observado no experimento em que extrato de carne foi empregado como única fonte de carbono.

Os resultados obtidos na Linha Experimental 2 apontam para acidogênese como a etapa com maior potencial de biodegradação de SMZ por cometabolismo. Na Etapa 1 observou-se que biodegradação de SMZ provavelmente não ocorre durante a hidrólise uma vez que a biodegradação de SMZ observada para frascos com sacarose, glicose e frutose foram as mesmas. Além disso, não foram observadas biodegradações de SMZ significativas nos frascos com ácidos acético, propiônico e butírico, sugerindo que a biodegradação de SMZ não está associada as etapas acetogênica e metanogênica. Na Etapa 3 os resultados sugerem que biodegradação de SMZ nos frascos com sacarose provavelmente ocorre durante a etapa acidogênica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante os experimentos da Linha de Investigação 1 não permitiram a obtenção dos parâmetros cinéticos intrínsecos da remoção de SMZ.

Em relação a Linha de Investigação 2, os resultados obtidos sugerem que extrato de carne, sacarose, glicose e frutose são compostos que contribuem efetivamente para a biodegradação de sulfametazina.

Além disso, a quantidade de matéria orgânica disponível no meio é um fator importante na de remoção da SMZ. Assim o cometabolismo parece ser o mecanismo responsável pela biodegradação de SMZ. Os resultados sugerem que o cometabolismo de SMZ pode estar associado a etapa acidogênica da biodegradação anaeróbia.

7 BIBLIOGRAFIA

- AIYUK, S.; FORREZ, I.; LIEVEN, D. K.; van HAANDEL, A.; VERSTRAETE, W. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates – A review. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2235–2241, 2005.
- BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIAŃSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, v. 196, p. 1–15, 2011.
- BERGMANN, B. A.; CHENG, J.; CLASSEN, J.; STOMP, A. In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresource Technology*, v. 73, p. 13-20, 2000.
- BRAUN, F.; HAMELIN, J.; BONNAFOUS, A.; DELGENÈS, N.; STEYER, J. P.; PATUREAU, D. Similar PAH Fate in Anaerobic Digesters Inoculated with Three Microbial Communities Accumulating Either Volatile Fatty Acids or Methane. *PLoS ONE*, v.10, p 1-20, 2015.
- BOXALL, A.B.A.; FOGG, L.A.; KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; PEMBERTON, E.J.; CROXFORD, A. Veterinary medicines in the environment, *Rev. Environ. Contam*, v. 180, p. 1–91, 2003.
- CARBALLA, M.; OMIL, F.; TERNES, T.; LEMA, J. M. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, v. 41, p. 2139-2150, 2007.
- CETECIOGLU, Z.; INCE, B.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; INCE, O.; ORHON, D. Biodegradation and reversible inhibitory impact of sulfamethoxazole on the utilization of volatile fatty acids during anaerobic treatment of pharmaceutical industry wastewater. *Science of the Total Environment*, v. 536, p. 667-674, 2015.
- CHERNICHARO, C. A. DE L., *Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento Biológico de águas residuárias*. DESA/UFMG. Belo Horizonte – MG, v.5, 1997.

- CRIDDLE, C.S. The kinetics of cometabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, p. 1048-1056, 1993.
- DA SILVEIRA, B. I. *Cinética Química das Reações Homogêneas*. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1996.
- DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, v. 107, n. SUPPL. 6, p. 907–938, 1999.
- DALTON, H.; STIRLING, D.I. Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 297, p. 481-496, 1982.
- DÍAZ-CRUZ, S. M. e BARCELÓ D. Analysis of antibiotics in aqueous samples. In PETROVIC, M. BARCELÓ D.; PEREZ S. *Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle: Occurrence and Transformation in the Environment*. Elsevier. cap. 2.1 p. 59-90, 2007.
- DRILLIA, P.; DOKIANAKIS, S. N.; FOUNTOULAKIS, M. S.; KORNAROS, M.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole, *Journal of Hazardous Materials*, v. 122, p. 259–265, 2005.
- FISCHER, K.; MAJEWSKI, M. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p. 6583-6597, 2014.
- GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 11, p. 1008-1022, 2008.
- GARCÍA GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Removal of sulfonamide antibiotics upon conventional activated sludge and advanced membrane bioreactor treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 404, n. 5, p. 1505–1515, 2012.
- GOMES, P. C. F.L.; TOMITA, I. N.; SANTOS-NETO, A., J.; ZAIAT, M. Rapid Determination of 12

Antibiotics and Caffeine in Sewage and Bioreactor Effluent by Online Column-Switching Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, n. 29, p. 8787-8801, 2015.

GONZÁLEZ-GIL, L.; KOOIJMAN, G.; LEMA, J.M.; CARBALLA, M. Biotransformation of organic micropollutants in the hydrolytic-acidogenic and methanogenic steps of sewage sludge anaerobic digestion. In: 14th World Congress on Anaerobic Digestion, 2015, Viña del Mar. *Proceedings of 14th World Congress on Anaerobic Digestion*, 2015.

HOFF, R. Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas. 134 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

HÖLZEL, C. S.; HARMS, K. S.; KÜCHENHOFF, H.; KUNZ, A.; MÜLLER, C.; MEYER, K.; SCHWAIGER, K.; BAUER, J. Phenotypic and genotypic bacterial antimicrobial resistance in liquid pig manure is variously associated with contents of tetracyclines and sulfonamides. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, n. 5, p. 1642-1656, 2010.

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

HORVATH, R. S. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriological Reviews*, v. 36, p.146-155, 1972.

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

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

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, v. 75, p. 435-441, 2009.

- LARCHER, S. e YARGEAU, V. Biodegradation of sulfamethoxazole: current knowledge and perspectives. *Microbiology Biotechnology*, v. 96, p. 309-318, 2012.
- LE-MINH, N.; KHAN, J. S.; DREWES, E. J.; STUETZ, M. R. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*, v. 44, p.4295-4323, 2010.
- MASON S.E.; BAYNES R.E.; BUUR J.L.; Riviere J.E.; Almond G.W. Sulfamethazine water medication pharmacokinetics and contamination in a commercial pig production unit. *Journal of Food Protection*, v. 71, n. 3, p. 584-589, 2008.
- MOHRING, S. A I.; STRZYSCH, I.; FERNANDES, M. R.; KIFFMEYER, T. K.; TUERK, J.; HAMSCHER, G. Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: a promising step on the way to sustainable pharmacy? *Environmental Science & Technology*, v. 43, n. 7, p. 2569-2574, 2009.
- OLIVEIRA, G. H. D.; SANTOS – NETO, A. J.; ZAIAT, M. Evaluation of sulfamethazine sorption and biodegradation by anaerobic granular sludge using batch experiments . *Bioprocess Biosystem Engineering* . v.39, p.115–124, 2016.
- OLIVEIRA, G. H. D. Remoção de sulfametazina em reatores anaeróbios tratando água residuária de suinocultura. 2016. 197 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- OTTMAR, K. J.; COLOSI, L.M.; SMITH, J. A. Fate and transport of atorvastatin and simvastatin drugs during conventional wastewater treatment. *Chemosphere*, v. 88, p. 1184-1189, 2012.
- ONESIOS, K. M.; YU, J. T.; BOUWER, E. J. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation*, v. 20, p. 441-466, 2009.
- PENTEADO, E. D.; LAZARO, C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 6137-6145, 2013.
- PÉREZ, S.; EICHHORN, P.; AGA, D. S. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment.

Environmental Toxicology and Chemistry, v. 24, n. 6, p. 1361-1367, 2005.

RIBEIRO, R. Influence of the carbon source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices. *Journal of Environmental Management*, v. 74, n. 2, p. 187-194, 2005.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 175, p. 45-95, 2010.

SEGHEZZO, L.; ZEEMAN, G.; van LIER, J. B.; H.; AMELERS, H.V.M.; LETTINGA, G. A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, v.65, p.175-190, 1998.

SILVA, B. G. Avaliação de materiais suporte como matriz de imobilização para biomassa anaeróbia acidogênica na produção de hidrogênio e de ácidos orgânicos voláteis a partir do licor de pentoses do bagaço de cana. 84p. Monografia (Graduação) – Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2013.

SPIELMEYER, A.; BREIER, B.; GROISSMEIER, K.; HAMSCHER, G. Elimination patterns of worldwide used sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, v. 193, p. 307-314, 2015.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER 21st Ed. Washington D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 2005.

SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. Nashville: Archae Press, 1983.

TRAN, N.H.; URASE, T.; KUKASABE, O. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *Journal of Hazardous Materials*, v. 171, p. 1051-1057, 2009.

TRAN, N. H.; URASE, T.; NGO, H. H.; HU, J.; ONG, S. L. Insight into metabolic and cometabolic

activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 721-731, 2013.

VELA, F. J.; GIANOTTI, E. P.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Estimation of Substrate Effective Diffusivities in Anaerobic Bioparticles. *Environmental Technology*, v. 20, n. 11, p. 1163–1170, 1999.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. A.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment – A review. *Science of the Total Environment*, v. 429, p. 123- 155, 2012.

VIEIRA, L. G. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; HOKKA, C.O. Estimation of Intrinsic Kinetic Parameters in Immobilised Cell Systems for Anaerobic Wastewater Treatment. *Biotechnology Techniques*, v.10. n. 9, p. 635-638,1996.

VIEIRA, L. G. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Intrinsic Kinetic Parameters of Substrate Utilization by Anaerobic Sludge Along the Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) Reactor. *Environmental Technology*, v. 18, n. 9, p. 953–957, 1997.

WATIKISON, J. A.; MURBY, J. E.; KOLPIN, D. W.; COSTANZO, D. S. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment*, v. 407, n. 8 p. 2711–2723, 2009.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; FORESTI, E. Cell wash-out and external mass transfer resistance in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge reactor. *Water Research*, v. 30, n. 10, p. 2435–2439, 1996a.

ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; FORESTI, E. Intrinsic Kinetic Parameters of Substrate Utilization by Immobilized Anaerobic Sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 53, n. 2, p. 220–225, 1996b.

ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; FORESTI, E. Liquid-Phase Mass Transfer in Fixed-Bed of Polyurethane Foam Matrices Containing Immobilized Anaerobic Sludge. *Biotechnology Techniques*, v.10. n. 2, p. 121-126,1996c.

ZAIAT, M.;PASSIG, F. H.; FORESTI, E A mathematical model and criteria for designing horizontal-

flow anaerobic immobilized biomass reactors for wastewater treatment *Bioresource Technology*, v.71, p.235-243, 1999.

ZAIAT, M.; RODRIGUES, J. A. D.; FORESTI, E. External and internal mass transfer effects in an anaerobic fixed-bed reactor for wastewater treatment. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 943–949, 2000.