

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA POR *Aliivibrio*
***fischeri* DE AMOSTRAS CONTAMINADAS COM**
SULFATO DE GENTAMICINA E NORFLOXACINO
BRUTAS E TRATADAS

Raquel Sampaio Jacob

Belo Horizonte

2014

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA POR *Aliivibrio
fischeri* DE AMOSTRAS CONTAMINADAS COM
SULFATO DE GENTAMICINA E NORFLOXACINO
BRUTAS E TRATADAS**

Raquel Sampaio Jacob

Raquel Sampaio Jacob

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA POR *Aliivibrio
fischeri* DE AMOSTRAS CONTAMINADAS COM
SULFATO DE GENTAMICINA E NORFLOXACINO
BRUTAS E TRATADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Meio Ambiente

Linha de pesquisa: Caracterização, prevenção e controle da poluição.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Liséte Celina Lange

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG

2014

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Parafrazeando Blaise Pascal, escrevi este texto longo, porque não tive tempo de fazê-lo curto. Agradecer é algo tão sublime que não pude ceder à tentação de fazer isso da forma tradicional. Permanecendo o vício pelos grandes pensadores, evoco Antoine de Saint Exupéry, que em sua célebre citação disse “Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, Mas não vai só... Leva um pouco de nós mesmos. E deixa-nos um pouco de si mesmos. Há os que levam muito, mas não há os que não deixam nada. Esta é a mais bela realidade da Vida... A prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se aproxima por acaso...”. Por confiar nessas palavras agradeço a cada um que passou pela minha vida, não apenas durante a pós-graduação, mas desde os primeiros anos de existência. Agradeço àqueles que lerão esse texto, mas também àqueles que sequer se lembram do meu nome ou não imaginam que estou concluindo um mestrado.

Sou especialmente grata aos meus pais e à Norma, que dos primeiros passos até as aflições com o encerramento do mestrado, acompanharam minha trajetória – o que faz com que sejam notadamente dignos de reconhecimento e carinho. Ao meu pai, inclusive, dedico essa dissertação; a ele, que das nuvens deve estar tremendamente desconfiado sobre o fato de fármacos e efluentes serem assuntos afins, mas que não deve hesitar nem por um segundo sequer em enviar as melhores energias e vibrações. Minha gratidão também aos meus irmãos e parentes, que de longe ou de perto acompanharam minha caminhada. Aos colegas e professores do Santo Agostinho também meu muito obrigada, lá adquiri a base de que tanto me orgulho. Em especial agradeço ao meu querido professor de biologia Samuel Gonçalves e ao meu professor de química Marcelo Marques - será necessário agradecer aos dois até o final da vida, pois foram eles os que me indicaram o caminho e apontaram minhas vocações -. Também menciono com amor amigos como Laila, Paula, Diva, Fabrício e Thaís que alegam meus dias, do outro canto da América ou quase do lado da minha casa, com programas *cults* ou completamente prosaicos, mas sempre extasiantes. Um agradecimento muito especial à minha grande amiga e confidente, Elis, que dividiu medos, tensões, gargalhadas, faltas de juízo e conselhos, dona de um espaço insubstituível em minha vida.

É necessário que eu também agradeça aos meus professores na PUC, mestres de uma ciência que eu amo e que me conduziram ao mestrado, sendo também responsáveis pela minha paixão pela carreira acadêmica. Ao Prof. Raul e ao amigo Carlos agradeço em especial, uma vez que

me acompanharam não apenas como aluna, mas também como profissional, lembraram-me incansavelmente de que eu poderia ser uma doutoranda, uma professora ou qualquer coisa que eu desejasse, desde que eu me esforçasse para isso. Agradeço também aos amigos da PUC, que antes dividiram legítima diversão e que agora partilham rugas de preocupações quanto à vida do biólogo formado em um mercado de trabalho instável. Não posso me esquecer de mencionar Silvinha e sua doçura infinita; muito obrigada a ela por permanecer presente.

Como não só de passado vive um homem, é necessário que eu brinde o presente. Eu inicio os salamaleques com a minha querida orientadora, Profa. Liséte Celina Lange, que me assegurou que guiaria meus primeiros passos trôpegos pela vida acadêmica, com todo o carinho e dedicação que lhe são peculiares. Sou muito grata a ela por ter me orientado, de fato, e por me demonstrar cotidianamente que a orientação não precisa ser acompanhada por rudeza e prepotência, que insistem em rondar as academias de todo o mundo. Prossigo agradecendo àquela que, extraoficialmente, foi também minha orientadora, tão paciente com minhas intermináveis dúvidas: sou grata a Lucilaine Valéria de Souza Santos, sobretudo, por ter deixado seu árduo trabalho a minha disposição, pela confiança, pelos ensinamentos e por ter me apresentado as usualidades típicas deste meio científico (tudo sempre, claro, com jaleco, luvas, óculos e cabelo preso!). Aprofundando ainda mais, consigo perceber que foram vários os meus orientadores: Profa. Mônica Leão, que mesmo carimbando um B no meu histórico, me ensinou sobre o esforço, a dedicação e a importância de estar ao lado daqueles com quem se partilha um ideal; Profa. Silvia Côrrea, que jamais me preveniu de um sorriso, que nunca negou um favor e que me fez mais responsável diante da necessidade de não decepcionar a confiança de alguém tão fabulosa. Também agradeço muito a Profa. Camila Amorim e a Profa. Miriam Amaral, por todo acompanhado em meu desenvolvimento no mestrado e todo o auxílio técnico que me proporcionaram nos estudos laboratoriais. Quem disse que orientadores são apenas os professores? Por isso, um muito obrigado a Danusa Teixeira, sempre pronta a me apontar o óbvio que não enxergava, a se sacrificar e me guiar com a maior e melhor das paciências. Agradeço, ainda, a Débora Viana, também companheira de graduação, pela presença constante e pela retidão e caráter que se expressavam em todas as suas posições. Agradeço a ela pelo trabalho compartilhado nos laboratórios (como brincávamos, minha aluna de iniciação científica de luxo), por ter dividido as agonias e também a estatística comigo, por ter me permitido crescer ao lado dela durante três anos. Lembro-me, também com imensa gratidão, da Aline Morena, quem me deixou um pouco

mais rechonchuda, mas também mais feliz durante o mestrado. Agradeço a ela por ter dividido comigo as preocupações e soluções, prometendo-a desde já que durante o doutorado vou ficar mais calma, aprender o nome das pessoas corretamente e, claro, gravar o lugar do ácido clorídrico. Agradeço também a Beatriz Reis, pois foi ela quem me lembrou de que todo desafio compartilhado fica mais leve e muitas vezes consegue se tornar, ainda, divertido. E é ao falar de compartilhar que me lembro da Rachel Lima (Rachelzinha), querida aluna de iniciação científica. Agradeço a ela que, entre suas corujas, esoterismo, livros, macrófitas, incubadoras e bactérias liofilizadas, me ensinou e me ensina muito. Por ter me ajudado tanto, sem esperar nenhuma retribuição e com tamanho carinho, jamais poderei corresponder à altura. Enfim, agradeço a todos que trocaram sorrisos e gentilezas comigo pelo Departamento: nos corredores, nas salas de estudo, no laboratório. Agradeço, ainda, aos funcionários, pelo insubstituível papel que cumprem, mas que muitas vezes permanecem anônimos.

Lembro-me daqueles que me ajudaram fora da UFMG: a Profa. Odete Rocha, Prof. Evaldo Espíndola, Profa. Daniele Bila e a Iara Almeida, agradeço por terem me acolhido, com carinho e disposição. Sou grata por terem aceitado dividir um pouco do que conhecem comigo e, assim, terem me tornado uma pessoa melhor. Ainda, registro uma gratidão especial a Aline Godoy, pesquisadora da Unifal e companheira durante meu tempo na UFSCar, que me recebeu de braços abertos e compartilhou todo seu conhecimento e pesquisa comigo, solicitude inestimável sem a qual decisões importantes não poderiam ter sido tomadas.

Por fim, agradeço com muito carinho ao meu grande companheiro, Erick Barbosa. Ele que já me acompanha há seis anos e topou dividir os sonhos e o futuro comigo, que suporta os meus nove cachorros (que, aliás, são os mais lindos do mundo), meus hábitos duvidosos e minha ansiedade infinita com uma felicidade genuína e um amor incomensurável. Ainda, pragmaticamente, pelas noites mal dormidas relendo ao meu lado todos os meus textos – incrementando-os e corrigindo os erros crassos –, por todas as traduções, por cada palavra “abstrusa” que me ensina, e por todas as apresentações impecáveis.

Finalmente, peço desculpas àqueles que não tiveram seu nome mencionado, mas a quem sou grata por compartilharem a existência comigo. E mesmo àqueles que me trouxeram dificuldades, eu agradeço, porque são as adversidades que me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole e a perseverança.

RESUMO

Uma grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Essas substâncias químicas, uma vez dispostas ou excretadas, tanto em sua forma original quanto em forma de metabólitos, muitas vezes permanecem estáveis após tratamentos convencionais ou mesmo avançados. A ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos, como fármacos. O objetivo desse trabalho foi de avaliar a análise ecotoxicológica por *Aliivibrio fischeri* de efluentes sintéticos brutos e tratados contaminados com sulfato de gentamicina e norfloxacino. Os tratamentos contemplados durante a pesquisa foram o biológico; por radiação UV; por H₂O₂; por UV/H₂O₂; por Fenton homogêneo e por foto-Fenton. O efluente bruto de norfloxacino a 15 mg/L é tóxico, já para o sulfato de gentamicina a 100 mg/L apresenta *hormesis*. Dentre os tipos testados de tratamento biológico, o mais eficiente é o que utiliza biomassa proveniente de reator UASB, seguido do Biodigestor Anaeróbio e, por último, Lodos Ativados. Quanto aos testes ecotoxicológicos, pode-se dizer que o reator UASB e Biodigestor Anaeróbio são suficientes para eliminar a toxicidade dos antibióticos, mas o processo por Lodos Ativados gera efluentes tóxicos. As análises ecotoxicológicas com amostras tratadas por H₂O₂ esclarecem que não há toxicidade remanescente, embora a eficiência de remoção dos fármacos seja baixa. Com relação ao tratamento por UV, ele é eficiente na degradação dos fármacos, porém apenas após longo tempo de reação. Além disso, não ocorre a mineralização completa dos antibióticos e ambas as amostras apresentam-se tóxicas. Já através do método por UV/H₂O₂, observou-se remoções de até 100% do norfloxacino e 90% do sulfato de gentamicina. Entretanto, em função da formação de subprodutos de degradação nocivos, ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização desse tratamento. Os experimentos otimizados por reagente de Fenton homogêneo proporcionaram degradações médias de 55% e 59% em termos de COT e UV/VIS, respectivamente, para o norfloxacino e de 82% em termos de COT para o sulfato de gentamicina. O tratamento foi eficiente na eliminação da toxicidade do norfloxacino, porém gerou um efluente tóxico a partir do sulfato de gentamicina. Com relação ao tratamento otimizado por foto-Fenton, embora seja mais eficiente na remoção dos fármacos que o tratamento por Fenton, gera amostras mais tóxicas, sobretudo no caso do sulfato de gentamicina.

Palavras chave: Norfloxacino; sulfato de gentamicina; ecotoxicidade; *Aliivibrio fischeri*.

ABSTRACT

Large quantities of different classes of pharmaceuticals are consumed annually, worldwide. These chemicals, once excreted, both in its original form and as metabolites, very often remain stable after conventional or even advanced treatments. Aquatic ecotoxicology may be a science of great value to support in addressing the problems of contamination of bodies of water by toxic compounds such as pharmaceuticals. The aim of this study was to assess the ecotoxicological analysis by *Aliivibrio fischeri* of raw and treated synthetic effluents contaminated with norfloxacin and gentamicin sulfate. The treatments contemplated in the study were the biological one, UV radiation, H₂O₂, UV/ H₂O₂, homogeneous Fenton reaction and photo-Fenton. The raw effluent of norfloxacin at 15 mg/L is toxic, whereas *hormesis* was detected for the raw effluent of gentamicin sulfate at 100 mg/L. Amongst the tested types of biological treatment, the more efficient is the one that uses biomass from the UASB reactor, followed by the Anaerobic Digester and, lastly, Activated Sludge. Regarding the ecotoxicological tests, one can say that the UASB reactor and the Anaerobic Digester are sufficient to eliminate the toxicity of antibiotics, while the Activated Sludge process generates toxic effluents. The ecotoxicological analyses of samples treated with H₂O₂ state that there is not residual toxicity, although the removal efficiency of the pharmaceuticals is low. On the topic of UV treatment, it is efficient to degrade the pharmaceuticals, but only after long reaction time. Moreover, a complete mineralization of antibiotics does not happen and both samples are considered toxic. On the other hand, for the UV/H₂O₂ method, there were 100% removals of norfloxacin and 90% of gentamicin sulfate. However, due to the formation of harmful by-products of degradation, both samples have become toxic after such processing. The experiments optimized by homogeneous Fenton reaction provided medium degradation of 55% (TOC) and 59% (UV/VIS), for the norfloxacin samples; and 82% (TOC) for the gentamicin sulfate samples. The treatment was effective in eliminating toxicity from norfloxacin, but it generated a toxic effluent from gentamicin sulfate. With respect to the treatment optimized by photo-Fenton, although it is more efficient in the removal of pharmaceuticals than the Fenton treatment, it generates more toxic samples, especially in the case of gentamicin sulfate.

Keywords: Norfloxacin; gentamicin sulfate; ecotoxicity; *Aliivibrio fischeri*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM FÁRMACOS.....	4
3.1.1 <i>Efeitos tóxicos</i>	5
3.1.2 <i>Antibióticos: um caso especial</i>	8
3.2 MÉTODOS DE TRATAMENTO PARA REMOÇÃO DE FÁRMACOS	10
3.2.1 <i>Tratamento biológico</i>	11
3.2.2 <i>Processos Oxidativos Avançados (POAs)</i>	13
3.3 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	19
3.3.1 <i>Tipos de testes ecotoxicológicos</i>	20
3.3.2 <i>Escolha do organismo-teste</i>	23
3.3.3 <i>Relação dose-resposta</i>	26
3.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS: ASPECTOS LEGISLADOS E PRÁTICAS VIGENTES	27
3.4.1 <i>Aspectos legislativos</i>	28
3.4.2 <i>Práticas vigentes</i>	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 MATERIAIS.....	32
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 <i>Teste ecotoxicológico</i>	33
4.2.2 <i>Tratamento biológico</i>	34
4.2.3 <i>Tratamento por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	36
4.2.4 <i>Tratamento por radiação ultravioleta (UV)</i>	37
4.2.5 <i>Tratamento por radiação ultravioleta combinada com peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂)</i>	38
4.2.6 <i>Tratamento por Fenton homogêneo</i>	39
4.2.7 <i>Tratamento por foto-Fenton homogêneo</i>	41
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS COM AS AMOSTRAS BRUTAS.....	42
5.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO	43
5.2.1 <i>Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos fármacos</i>	43
5.2.2 <i>Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento biológico</i>	50
5.3 TRATAMENTO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂).....	53
5.3.1 <i>Degradação por H₂O₂ do norfloxacino e sulfato de gentamicina</i>	53
5.3.2 <i>Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por H₂O₂</i>	54
5.4 TRATAMENTO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV)	55
5.4.1 <i>Actinometria</i>	55
5.4.2 <i>Degradação por fotólise do norfloxacino e sulfato de gentamicina</i>	55
5.4.3 <i>Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV</i>	58
5.5 TRATAMENTO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA COMBINADA COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (UV/H ₂ O ₂).....	60
5.5.1 <i>Degradação do norfloxacino e sulfato de gentamicina por UV/H₂O₂</i>	60
5.5.2 <i>Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV/H₂O₂</i>	64
5.6 TRATAMENTO POR FENTON HOMOGÊNEO	65

5.6.1	<i>Degradação do norfloxacino e sulfato de gentamicina por Fenton.....</i>	<i>65</i>
5.6.2	<i>Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por Fenton.....</i>	<i>68</i>
5.7	TRATAMENTO POR FOTO-FENTON HOMOGÊNEO	70
5.7.1	<i>Degradação do norfloxacino e sulfato de gentamicina por foto-Fenton.....</i>	<i>70</i>
5.7.2	<i>Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por foto-Fenton.....</i>	<i>71</i>
5.8	AVALIAÇÃO GERAL	73
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
6	CONCLUSÕES	76
7	RECOMENDAÇÕES.....	78
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Concentração de fármacos em esgoto tratado (a) e águas superficiais (b)	5
Figura 3.2 – (a) Toxicidade aguda de 24 fármacos, expressa em valores de CE50 ou CL50 para diferentes tipos de organismos. (b) Toxicidade crônica de 10 fármacos, expressa em valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito	7
Figura 3.3 – Estrutura molecular do antibiótico norfloxacino	9
Figura 3.4 – Estrutura molecular do antibiótico sulfato de gentamicina	10
Figura 3.5 – Curva de dose-resposta hipotética para um efluente qualquer. A concentração do efluente é dada pela porcentagem de diluição da amostra do efluente na solução-teste. A linha contínua representa a resposta nas primeiras 24 horas e a linha pontilhada após 48 horas de exposição	27
Figura 5.1 – Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de norfloxacino nos tempos 5, 15 e 30 minutos	42
Figura 5.2 – Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de norfloxacino nos tempos 5, 15 e 30 minutos	43
Figura 5.3 – Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia (a) e anaeróbia (b) dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina	43
Figura 5.4 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacino sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: Lodos Ativados - $C_{inicial}= 90,36\text{mg/L}$ e $C_{final}=14,8\text{mg/L}$; Biodigestor - $C_{inicial}= 99,8\text{mg/L}$ e $C_{final}= 15,2\text{mg/L}$; UASB - $C_{inicial}= 128,2\text{mg/L}$ e $C_{final}= 15\text{mg/L}$	44
Figura 5.5 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacino com aclimação da biomassa. Condições experimentais: Lodos Ativados → $C_{inicial}= 104,5\text{mg/L}$ e $C_{final}=11\text{mg/L}$; Biodigestor → $C_{inicial}= 133,6\text{mg/L}$ e $C_{final}= 17,6\text{mg/L}$; UASB → $C_{inicial}= 175,3\text{mg/L}$ e $C_{final}= 18,6\text{mg/L}$	45
Figura 5.6 – Monitoramento por UV/VIS da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacino sem aclimação da biomassa	45
Figura 5.7 – Monitoramento por UV/VIS da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacino com aclimação da biomassa	46
Figura 5.8 – Eficiência da biodegradabilidade do Norfloxacino, em termos de COT e UV/VIS, utilizando biomassa aclimatada e sem aclimação	47
Figura 5.9 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade aeróbia do sulfato de gentamicina com e sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: Lodos Ativados	

sem aclimação → $C_{inicial} = 60,8\text{mg/L}$ e $C_{final} = 24,2\text{mg/L}$; Lodos Ativados com aclimação → $C_{inicial} = 186,5\text{mg/L}$ e $C_{final} = 36,1\text{mg/L}$ 48

Figura 5.10 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade anaeróbia (biodigestor anaeróbio) do sulfato de gentamicina com e sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: Biodigestor sem aclimação → $C_{inicial} = 114,8\text{mg/L}$ e $C_{final} = 19,2\text{mg/L}$. Biodigestor com aclimação → $C_{inicial} = 179,7\text{mg/L}$ e $C_{final} = 21,8\text{mg/L}$ 49

5.11 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade anaeróbia (UASB) do sulfato de gentamicina com e sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: UASB sem aclimação → $C_{inicial} = 68,1\text{mg/L}$ e $C_{final} = 7,1\text{mg/L}$; UASB com aclimação → $C_{inicial} = 135,8\text{mg/L}$ e $C_{final} = 9\text{mg/L}$ 49

Figura 5.12 – (A) % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em reator controle de Lodos Ativados com biomassa aclimatada com norfloxacino (B) % de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em reator de Lodos Ativados contaminado com norfloxacino e utilizando biomassa aclimatada 52

Figura 5.13 – Monitoramento da degradabilidade do antibiótico norfloxacino utilizando H_2O_2 e leitura por UV/VIS em 273 nm. Condições experimentais: Norfloxacino_{inicial} = 15mg/L ; [1]:[0,5] → Norfloxacino_{final} = $14,5\text{mg/L}$; [1]:[1] → Norfloxacino_{final} = $14,7\text{mg/L}$; [1]:[1,5] → Norfloxacino_{final} = $14,8\text{mg/L}$; [1]:[2] → Norfloxacino_{final} = $14,9\text{mg/L}$; temperatura = 28°C ; pH 3 53

Figura 5.14 – Monitoramento da degradabilidade do antibiótico sulfato de gentamicina utilizando H_2O_2 e leitura por COT. Condições experimentais: [Sulfato de gentamicina] = 100mg/L ; $C_{inicial} = 17,8\text{mg/L}$; [1]:[0,5] → $C_{final} = 17,2\text{mg/L}$; [1]:[1] → $C_{final} = 17,8\text{mg/L}$; [1]:[1,5] → $C_{final} = 16,6\text{mg/L}$; [1]:[2] → $C_{final} = 17,7\text{mg/L}$; temperatura = 28°C ; pH 3 54

Figura 5.15 – Intensidade luminosa da lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão de 6W de potência em função do tempo 55

Figura 5.16 – Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: Norfloxacino_{inicial} = 15mg/L ; 320nm → Norfloxacino_{final} = $7,5\text{mg/L}$; 273nm → Norfloxacino_{final} = $2,25\text{mg/L}$; Intensidade da luz = $4,94 \cdot 10^{-05}\text{Einstein/min}$; temperatura = 27°C ; pH=7; $\lambda=273\text{nm}$ e 320nm 56

Figura 5.17 – Espectro de absorção do norfloxacino com máximo em 273 nm e dos seus produtos de degradação com máximo em 293 nm 57

Figura 5.18 – Mineralização do antibiótico norfloxacino por fotólise 57

Figura 5.19 – Decomposição determinada por COT do sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: [Sulfato de gentamicina] = 100mg/L ; $C_{inicial} = 26,5\text{mg/L}$; $C_{final} = 6,3\text{mg/L}$; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}\text{Einstein/min}$; temperatura: 27°C ; pH=7..... 58

Figura 5.20 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com norfloxacino e submetida a tratamento por UV	59
Figura 5.21 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento por UV	59
Figura 5.22 – Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. Condições experimentais: Norfloxacino _{inicial} = 15 mg/L; Fotólise → Norfloxacino _{final} = 1,5 mg/L; [1]:[1] → Norfloxacino _{final} = 1,2 mg/L; [1]:[2], [1]:[3], [1]:[4], [1]:[5], [1]:[6] → Norfloxacino _{final} = 0 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; pH=7; $\lambda=273$ nm.....	61
Figura 5.23 – Degradação do norfloxacino através da radiação ultravioleta com proporção [C]:[OH ⁻] de [1]:[3] e variação de pH. Condições experimentais: Norfloxacino _{inicial} = 15 mg/L; Norfloxacino _{final} = 0 mg/L Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; $\lambda=273$ nm.....	62
Figura 5.24 – Decomposição do sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. Condições experimentais: [Sulfato de gentamina] = 100 mg/L; C _{inicial} = 24,8mg/L; [1]:[1] → C _{final} = 2,8 mg/L; [1]:[2,5] → C _{final} = 5,8 mg/L; [1]:[3] → C _{final} = 6,4 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; pH=7.....	63
Figura 5.25 – Degradação do sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta utilizando a relação [C][OH ⁻][1][2.5] e variação de pH. Condições experimentais: [Sulfato de gentamina]= 100 mg/L; C _{inicial} = 24,8mg/L; pH 3 → C _{final} = 2,8 mg/L; pH 7 → C _{final} = 4,3 mg/L; pH 7 → C _{final} = 11,6 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C ...	63
Figura 5.26 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com norfloxacino e submetida a tratamento otimizado por UV/H ₂ O ₂	64
Figura 5.27 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento otimizado por UV/H ₂ O ₂	65
Figura 5.28 – Relação entre as eficiências de mineralização e degradação do antibiótico norfloxacino por COT e UV/Vis nos ensaios de Fenton	67
Figura 5.29 – Porcentagem de degradação do antibiótico sulfato de gentamicina por COT nos ensaios de Fenton.....	68
Figura 5.30 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento otimizado por Fenton homogêneo	69
Figura 5.31 – Degradação do antibiótico norfloxacino por foto-Fenton. Condições experimentais: Norfloxacino _{inicial} = 15 mg/L; Norfloxacino _{final} = 5,2 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C, pH 3	71

Figura 5.32 – Degradação do antibiótico sulfato de gentamicina por foto-Fenton. Condições experimentais: [Sulfato de gentamicina]= 100 mg/L; $C_{inicial}$ = 17,5 mg/L; C_{final} = 1,2 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C, pH 3	71
Figura 5.33 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com norfloxacino e submetida a tratamento otimizado por foto-Fenton.....	72
Figura 5.34 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento otimizado por foto-Fenton	73
Figura 5.35 – Dados de CE_{50} para <i>Aliivibrio fischeri</i> das amostras contaminadas com norfloxacino e sulfato de gentamicina após os diversos tipos de tratamento.....	74
Figura 5.36 – Maior % de efeito de inibição (redução de luminosidade) encontrada em testes de toxicidade com <i>Aliivibrio fischeri</i> de amostras contaminadas com norfloxacino e sulfato de gentamicina e submetidas a diferentes tipos de POAs.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Alguns fármacos e metabólitos monitorados no Brasil nos anos de 1996/97.....	11
Tabela 3.2 – Avaliação da biodegradabilidade de alguns fármacos	13
Tabela 3.3 – Relação de trabalhos que utilizam POAs para tratarem fármacos.....	14
Tabela 3.4 – Compostos encontrados após tratamento biológico; limite de quantificação e % de remoção por UV, UV/H ₂ O ₂	17
Tabela 3.5 – Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade	22
Tabela 3.6 – Normas da ABNT que normalizam a realização de teste ecotoxicológicos	29
Tabela 3.7 – Manuais CETESB para padronização de testes ecotoxicológicos.....	30
Tabela 4.1 – Relação antibiótico/glicose durante o período de aclimação da biomassa.....	34
Tabela 4.2 – Composição das soluções de nutrientes para os reatores anaeróbios	35
Tabela 5.1 – Resultados de toxicidade (CE50) de efluentes provenientes de tratamento por Lodos Ativados (aclimatados e não aclimatados)	51
Tabela 5.2 – Relação entre as eficiências de mineralização e degradação do antibiótico norfloxacino nos ensaios de Fenton por COT e UV/Vis (273nm), respectivamente	66
Tabela 5.3 – Degradação do antibiótico sulfato de gentamicina por COT nos ensaios de Fenton.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CE₅₀	Concentração Efetiva Média
CENO	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
CERH	Conselho Estadual de Recursos Hídricos
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
COT	Carbono Orgânico Total
CL₅₀	Concentração Letal Média
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COPAM	Conselho Estadual de Política Ambiental
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
D.N	Deliberação Normativa
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DL₅₀	Dose Letal Média
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ICSU	Committee of International Council of Scientific Unions
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
POA	Processos Oxidativos Avançados
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RPM	Rotações por minuto
SMA	Secretaria de Meio Ambiente
UASB	Reatores anaeróbios de manta de lodo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultra Violeta

1 INTRODUÇÃO

Uma grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Estes compostos farmacêuticos incluem antiinflamatórios, antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, antidepressivos, agentes quimioterápicos, contraceptivos e outros mais. Depois do uso, esses compostos são parcialmente metabolizados e excretados na urina e fezes, e subseqüentemente entram nas estações de tratamento de esgoto (ETEs), onde são tratados, juntamente com outros constituintes orgânicos e inorgânicos do efluente (TAMBOSI, 2008). De acordo com Gebhardt e Schröder (2007), esses fármacos, uma vez dispostos ou excretados, tanto em sua forma original quanto em forma de metabólitos, muitas vezes permanecem estáveis após tratamentos convencionais ou mesmo avançados. Portanto, ainda que alguns desses fármacos, altamente polares e móveis, possam ser parcialmente removidos por meio da sorção, degradação biótica/abiótica ou tecnologias com membranas – como a osmose inversa ou nanofiltração – eles podem eventualmente alcançar corpos d’água superficiais e subterrâneos, sabidas fontes de água potável (GEBHARDT; SCHRÖDER, 2007; TAMBOSI, 2008).

A contaminação de corpos d’água por fármacos pode advir de esgotos domésticos e hospitalares, mas a contribuição de efluentes e resíduos industriais também é significativa (STACKELBERG *et al.*, 2004). Exemplo disso são os aterros industriais, que recebem grande diversidade de resíduos, o que geralmente leva a formação de um lixiviado contaminado por fármacos (TURNER; HARDY; TAPPER, 1993; HOLM *et al.*, 1995). A indústria farmacêutica também exerce influência nesse cenário (LARRSON; PEDRO; PAXEUS, 2007), os efluentes gerados são contaminados por fármacos e podem, em geral, serem caracterizados por uma fração orgânica rapidamente biodegradável e compostos refratários, que não são removidos por tratamentos biológicos convencionais, como no caso da formulação de antibióticos, cujo efluente apresenta baixa biodegradabilidade (ALMEIDA *et al.*, 2004). A suinocultura e bovinocultura também contribuem para a contaminação de corpos d’água. Estudos evidenciam que em criações de bovinos e suínos, não apenas os efluentes estão contaminados por antibióticos e hormônios, como também as águas subterrâneas próximas (BARTELT-HUNT; SNOW; DAMON-POWELL, 2010).

A ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos, como fármacos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Seus instrumentos de análise são capazes de responder preditivamente à toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos. Exemplos da funcionalidade desse exame para o objeto de estudo do presente trabalho são estudos recentes, que indicam que antibióticos, como os do grupo das penicilinas, podem exercer efeitos tóxicos a organismos aquáticos e até promover o desenvolvimento de cepas bacterianas multi-resistentes (ALMEIDA *et al.*, 2004). A inserção dos ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos dos poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

De acordo com Gebhardt e Schröder (2007); Tambosi (2008) e Löffler *et al.* (2005), a eficácia dos métodos tradicionais de tratamento não garantem uma redução significativa na concentração dos fármacos ou de seus metabólitos nos corpos d'água. Mesmo diante desse cenário, os trabalhos que abordam a contaminação de efluentes por fármacos são escassos na literatura, sobretudo, os que analisam a importância de estudos ecotoxicológicos nesse contexto. Um dos motivos que explica essa situação é o fato de que a investigação extensiva da ocorrência de fármacos no ambiente iniciou-se na década de 1990, com o aprimoramento dos métodos analíticos que possibilitaram determinar fármacos em concentrações de ng/L ou µg/L em matrizes aquosas, tais como esgotos, efluentes industriais, águas superficiais, subterrâneas e mesmo potável (LÖFFLER *et al.*, 2005). A tecnologia desenvolvida para esse fim ainda é incipiente, tornando ainda mais difícil esse tipo de investigação.

Pelo exposto, apresenta-se pesquisa com objetivo principal de avaliar a análise ecotoxicológica por *Aliivibrio fischeri* de efluentes sintéticos brutos e tratados contaminados com sulfato de gentamicina e norfloxacino. A hipótese é de que a contaminação por fármacos garantiria toxicidade às amostras analisadas e de que essa toxicidade seja afetada de diferentes maneiras frente a distintos tipos de tratamentos físico-químicos e biológicos. O desenvolvimento dessa pesquisa é igualmente imperioso por toda a literatura apresentada a seguir, que aponta para a necessidade e relevância acadêmica dessa proposta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar análise ecotoxicológica por *Aliivibrio fischeri* de efluentes sintéticos brutos e tratados contaminados com sulfato de gentamicina e norfloxacino.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar, em termos de toxicidade aguda, qual entre os tratamentos utilizados, biológicos e POAs, é mais adequado para tratar efluentes sintéticos contaminados com os antibióticos sulfato de gentamicina e norfloxacino e de que forma a toxicidade desses efluentes é afetada pelos tratamentos;
- Verificar a sensibilidade do organismo teste, *Aliivibrio fischeri*, à contaminação pelos antibióticos pesquisados;
- Verificar a capacidade do teste ecotoxicológico com *Aliivibrio fischeri* de funcionar como ferramenta na avaliação da qualidade das águas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Caracterização de efluentes contaminados com fármacos*

O lançamento de carga proveniente de efluentes diretamente em lagos e rios é motivo de crescente preocupação. Medicamentos são freqüentemente detectados em efluentes em níveis que variam de 1 ng/L até g/L. Dentre os efeitos causados por este nível de contaminação, citam-se a feminização de peixes, em função da presença de hormônios; efeitos negativos na reprodutividade e sobrevivência de organismos em função da exposição em laboratório a propranolol, diclofenaco, gemfibrozil, ibuprofeno e fluoxetina; além do aparecimento de bactérias resistentes à antibióticos (LARRSON; PEDRO; PAXEUS, 2007).

Os fármacos são uma classe emergente de contaminantes ambientais que tem crescente aplicação, tanto para uso humano, quanto para medicina veterinária. Na União Europeia, por exemplo, cerca de trezentas diferentes substâncias são utilizadas no auxílio das mazelas humanas, veterinárias e de plantas. Esses compostos químicos são desenvolvidos para apresentarem um modo muito específico de ação e muitos deles são altamente persistentes no ambiente. Dentre os diversos fármacos usualmente encontrados em rios, lagoas, efluentes sanitários tratados, água subterrânea e mesmo água potável (Figura 3.1), os mais freqüentemente listados são antiinflamatórios não-esteroidais, como o ácido acetilsalicílico e o diclofenaco, além da metformina, antibióticos, reguladores de colesterol e carbamazepina (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Fent; Weston e Caminada (2006) citando Ternes (1998) exemplificam tal situação através de trabalho que encontrou 32 (trinta e dois) diferentes tipos de medicamentos em esgoto sanitário tratado, rios e lagoas na Alemanha.

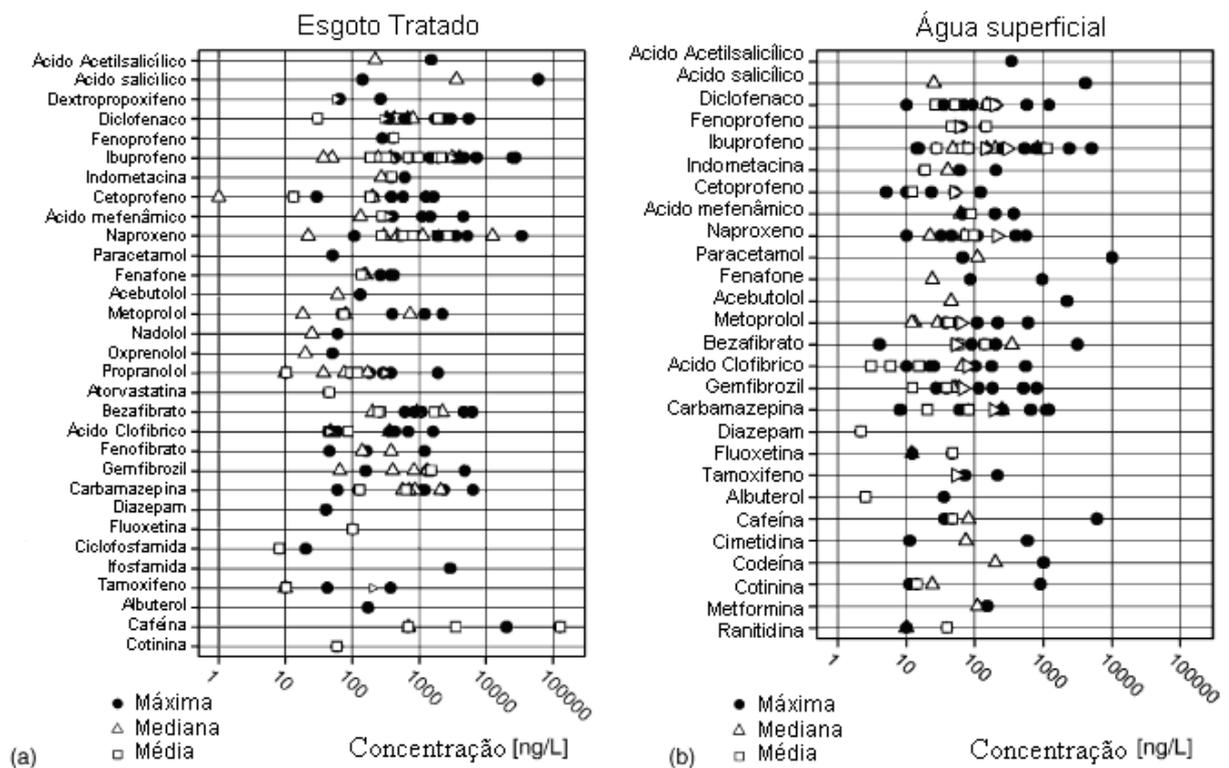


Figura 3.1 – Concentração de fármacos em esgoto tratado (a) e águas superficiais (b)
Fonte: Adaptado de FENT; WESTON & CAMINADA (2006).

LINDBERG *et al.* (2005) relataram que as fluorquinolonas são os antibióticos mais frequentemente detectados em efluentes e que na maioria da vezes estão acima do limite de quantificação. Em outros estudos realizados por LINDBERG *et al.* (2006), os antibióticos norfloxacino e ciprofloxacino foram detectados em 97% e o ofloxacino em 50% das amostras analisadas.

3.1.1 Efeitos tóxicos

Os fármacos são projetados para atuar em vias metabólicas e moleculares específicas de humanos e animais, mas frequentemente exibem efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no meio ambiente podem afetar organismos que tenham estrutura similar aos humanos, bem como organismos com estruturas distintas, em que os mecanismos de ação desses químicos é desconhecido (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

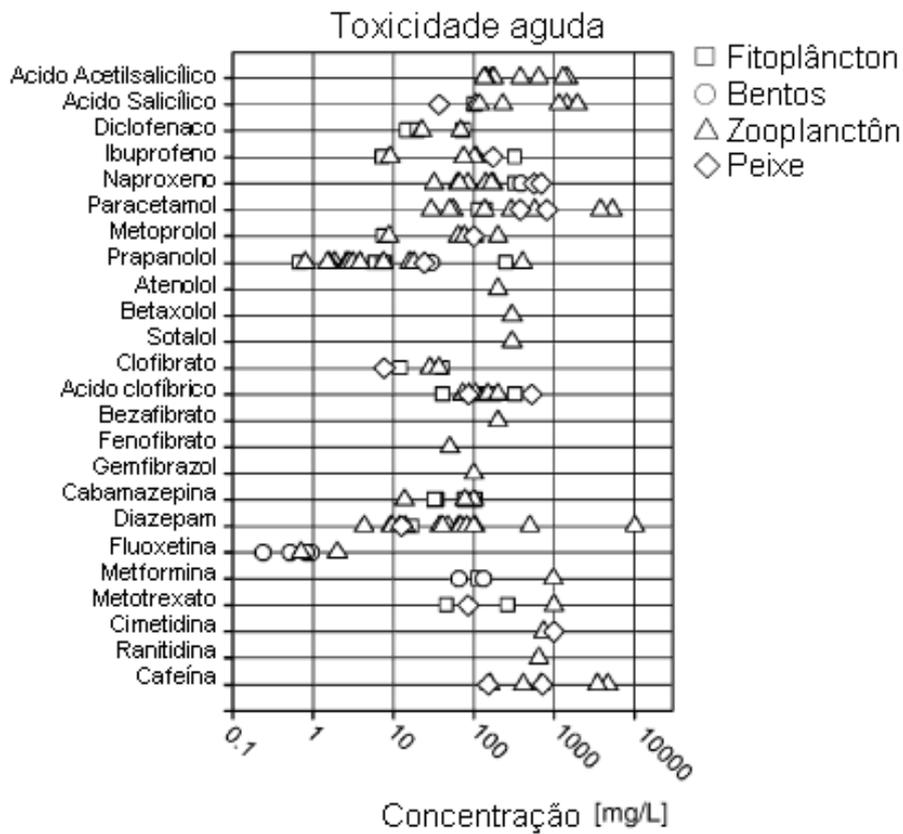
Nesse sentido, Quinn; Gagné e Blaise (2008) avaliaram o potencial tóxico de onze fármacos sobre a cnidária *Hydra attenuata*, um microrganismo invertebrado existente nas águas doces da Europa, da Ásia e nas Américas. Os autores observaram que a regeneração do microrganismo foi inibida nas concentrações de 0,1; 5 e 1 mg L⁻¹ de genfibrozil, ibuprofeno e

naproxeno, respectivamente e a altas concentrações de 50 mg L⁻¹ para bezafibrato e trimetropim. Por outro lado, a carbamazepina e os antibióticos sulfapiridina e oxitetraciclina estimularam a regeneração da cnidária quando aplicados em concentrações de 25, 5 e 50 mg L⁻¹, respectivamente.

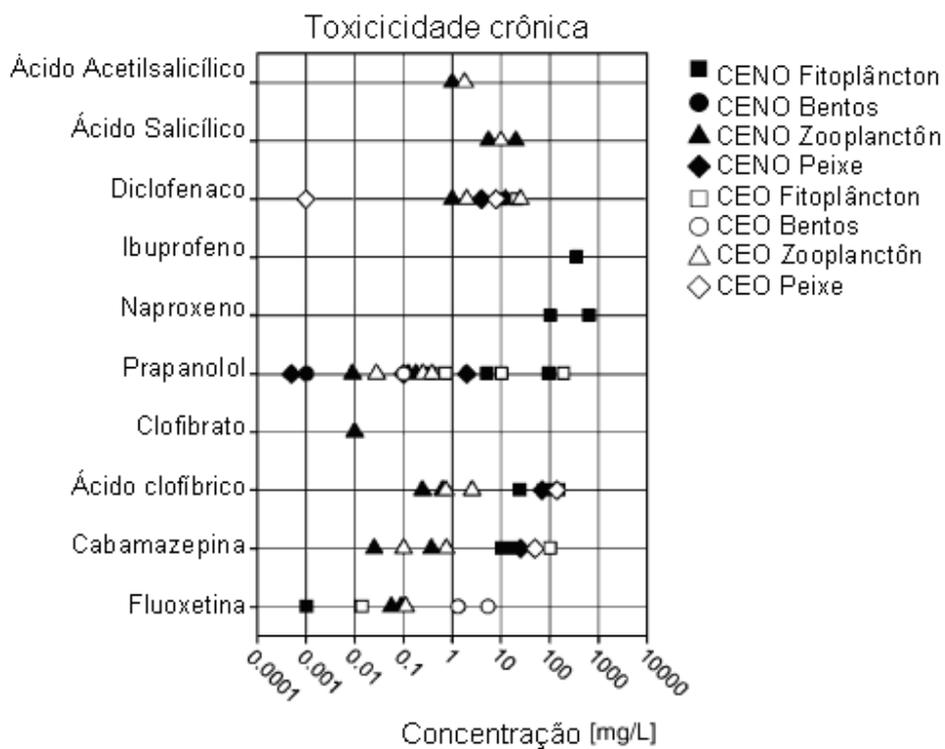
Dados que corroboram com os citados são os de Gunnarsson e colaboradores (2009), que avaliaram o efeito de exposição de efluente industrial altamente diluído (1:500) na espécie de peixe Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os resultados mostraram influência na expressão gênica e atividade enzimática do animal, como também na função hepática e renal, na atividade do citocromo P450 1A e alteração nos níveis de fosfato no plasma sanguíneo.

Buscando conhecer com mais clareza os efeitos de medicamentos em organismos no meio ambiente, são feitos testes ecotoxicológicos. De acordo com Webb (2001) citado por Fent; Weston e Caminada (2006), os testes de toxicidade aguda que comparam diferentes níveis tróficos, sugerem que algas são mais sensíveis ao contato com fármacos que a *Daphnia magna*, seguidos pelos peixes. Os mesmos estudos demonstram, ainda, que as classes mais tóxicas de fármacos são os antidepressivos, antibióticos e antipsicóticos. No entanto, a ação desses compostos apresenta efeitos muito variáveis entre os diversos filões de seres vivos. Já com relação à toxicidade crônica, os experimentos são escassos. São raros os trabalhos que buscam identificar os efeitos principais da exposição de fármacos a longo prazo ou conseqüências nos diferentes estágios do ciclo de vida dos organismos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Na figura 3.2 estão dispostos dados de toxicidade crônica e aguda compilados por Fent; Weston e Caminada (2006).

A figura 3.2 permite observar o amplo espectro de variação do efeito dos fármacos entre indivíduos de espécies diferentes. Evidencia, ainda, a elevada toxicidade de fármacos como a fluoxetina, que em concentrações inferiores ou próximas a 1 mg/L é capaz de causar efeito deletério em testes de toxicidade aguda com fitoplâncton, zooplâncton, organismos bentônicos e peixes.



(a)



(b)

Figura 3.2 – (a) Toxicidade aguda de 24 fármacos, expressa em valores de CE50 ou CL50 para diferentes tipos de organismos. (b) Toxicidade crônica de 10 fármacos, expressa em valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito

Fonte: Adaptado de FENT; WESTON & CAMINADA (2006).

3.1.2 Antibióticos: um caso especial

Antibióticos são, provavelmente, a família de medicamentos de mais sucesso já desenvolvida para garantir a melhoria da saúde humana. Além dessa aplicação fundamental, esses medicamentos vêm sendo utilizados para prevenir e tratar infecções de animais e plantas, além de promover o crescimento no ramo da agropecuária (MARTINEZ, 2009). Por esse motivo, antibióticos correspondem à maior categoria de fármacos utilizados na medicina humana e veterinária. Eles normalmente são detectados em afluentes e efluentes de plantas de tratamento de esgotos municipais na ordem de ng/L e µg/L. KRAUSE (2009), realizou estudo demonstrando que vários antibióticos possuem uma moderada persistência em águas superficiais, tanto em condições aeróbias, como anaeróbias.

A grande discussão sobre a importância da remoção dos antibióticos em sistemas de tratamento de efluentes se deve ao fato deles promoverem a resistência bacteriana (KRAUSE, 2009). Como foi afirmado pela Organização Mundial da Saúde, o aumento significativo de patógenos humanos com resistência a antibióticos é uma preocupação especial, não apenas no que diz respeito ao tratamento de doenças infecciosas, como também para outras patologias em que a profilaxia com antibióticos é necessária para evitar infecções oportunistas. Neste sentido, a propagação de bactérias resistentes “significa que procedimentos médicos comuns, anteriormente consagrados, podem mostrar-se inúteis” (OMS, 2000).

Vale lembrar que, mesmo que a poluição por antibióticos seja extinta, a população de bactérias resistentes permanece por várias gerações. De acordo com Martinez (2009), vários mecanismos permitem a manutenção e, eventualmente, disseminação de genes de resistência antibiótica em ecossistemas naturais, de modo que diferentemente da contaminação por antibióticos, a poluição por genes de resistência não desaparece com a extinção da contaminação.

Ainda de acordo com Martinez (2009), com o objetivo de reduzir os efeitos da liberação de antibióticos na seleção de patógenos mais resistentes, a União Européia banuiu o uso de antibióticos de relevância humana para a promoção do crescimento na agropecuária em 1998. Em 2006 a proibição foi estendida para todos os antibióticos e compostos afins. De maneira similar, vários países restringiram o uso de antibióticos na aquicultura, incluindo exigentes proibições no uso de profilaxia antibiótica, além de restrições à utilização de antibióticos que

são úteis no tratamento de infecções humanas. Por exemplo, a utilização de quinolonas para aquicultura foi proibido, isso porque esses antibióticos podem permanecer ativos em sedimentos por longos períodos e a resistência a um membro da família do fármaco, geralmente confere resistência a todas as quinolonas.

Em trabalho que exemplificou o potencial tóxico sinérgico e individual de antibióticos, Yang e colaboradores (2008) testaram a toxicidade de doze antibióticos: triclosan, triclocarban, roxitromicina, claritromicina, tylosin, tetraciclina, clortetraciclina, norfloxacin, sulfametazona, ciprofloxacino, sulfametazina e trimetropim; aqui dispostos em ordem crescente de toxicidade. As análises foram realizadas com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, de forma a avaliar a inibição em seu crescimento. Dentre os resultados, nota-se o importante efeito antagônico da combinação entre triclosan e norfloxacin, onde a mistura apresentou-se menos tóxica do que seus próprios componentes individualmente considerados.

3.1.2.1 Norfloxacin

As fluoroquinolonas, como o ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacin e ofloxacina, fazem parte de um grupo de substâncias químicas sintéticas derivadas do ácido nalidíxico com atividade antimicrobiana. Possuem extensivas aplicações tanto na medicina humana quanto veterinária, sendo consideradas importantes armas no combate a organismos gram-negativos e gram-positivos, as últimas gerações destes agentes antimicrobianos chegam a ser ativas contra as bactérias anaeróbias (SILVA *et al*, 2010).

O antibiótico norfloxacin ou norfloxacina (Figura 3.3) é um bactericida potente de amplo espectro, utilizado principalmente no tratamento de infecções urinárias e pulmonares. Tem sido prescrito em excesso e sem necessidade, principalmente em pronto-atendimentos, onde o médico não acompanhará o caso do paciente e então opta por uma medicação mais potente.

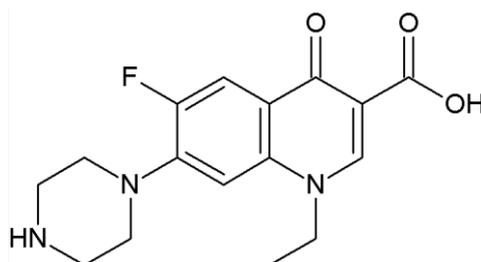


Figura 3.3 – Estrutura molecular do antibiótico norfloxacin

3.1.2.2 Sulfato de gentamicina

Os aminoglicosídeos são antibióticos de grande interesse clínico devido a sua eficiência no tratamento contra bacilos Gram-negativos aeróbios, particularmente as *Enterobacteriaceae* e a *P. aeruginosa*. Geralmente são utilizados associados a outros antibióticos no tratamento de infecções graves (MONTEIRO *et al*, 2001). Na medicina veterinária e na produção animal os aminoglicosídeos são largamente utilizados no tratamento de enterites bacterianas (diarreia no gado) e mastites, sendo frequente sua adição às rações por profilaxia e como promotores de crescimento (STEAD, 2000).

O sulfato de gentamicina, amicacina, esteptomicina e a neomicina são exemplos desse grupo de fármacos. O sulfato de gentamicina (Figura 3.4), um dos representantes mais expressivos, por se tratar de um antibiótico de largo espectro, vem sendo utilizado no tratamento de infecções sistêmicas graves provocadas por bacilos gram-negativos.

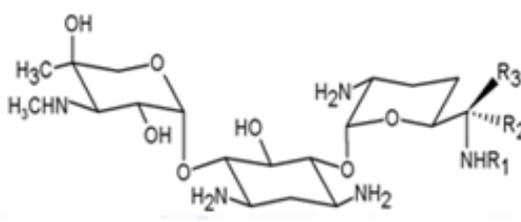


Figura 3.4 – Estrutura molecular do antibiótico sulfato de gentamicina

3.2 **Métodos de tratamento para remoção de fármacos**

A busca de um tratamento que seja 100% eficiente é um desafio. Por um lado, existem efluentes com diferentes composições e, por outro, existem diferentes tipos de tratamentos. Dependendo da qualidade da água, das exigências finais e dos aspectos econômicos, alguns processos são mais adequados que outros. Andreozzi; Marrota e Paxéus (2003) realizaram um estudo comparativo de oito técnicas para a remoção de sete antibióticos (carbadox, sulfaclopiridazina, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfatiazol e trimetoprima). Eles concluíram que a adsorção em carvão ativado, a osmose inversa, a cloração e a ozonização são técnicas eficientes para a remoção dos antibióticos estudados, sob os parâmetros de uma planta típica de tratamento de água. Contrariamente, a coagulação/floculação/sedimentação com sais de alumínio e de ferro, o abrandamento com excesso de soda, a fotólise e a troca iônica foram métodos relativamente ineficientes na remoção desses fármacos.

3.2.1 Tratamento biológico

Os métodos convencionais de tratamento de efluentes removem matéria orgânica por meio de reações bioquímicas e podem envolver, tanto microrganismos aeróbios, quanto anaeróbios. Esses métodos buscam simular os processos naturais de decomposição da matéria orgânica, que ocorrem nos cursos d'água após o lançamento de um efluente. Objetivando melhorias na eficiência deste tipo de tratamento, novas etapas têm sido incorporadas ao sistema. Um exemplo é o tratamento terciário ou “polimento”, que objetiva uma remoção adicional de poluentes antes do lançamento do efluente no corpo receptor.

Em balanço realizado entre as concentrações de fármacos na entrada e saída das plantas de tratamento de esgotos e efluentes, TERNES (1998) revela que durante o tratamento nem todos os fármacos são completamente removidos (Tabela 3.1). Consequentemente, eles são encontrados nas águas superficiais uma importante fonte de água potável.

Tabela 3.1 – Alguns fármacos e metabólitos monitorados no Brasil nos anos de 1996/97

Substância	Classe das Substâncias	Concentração	
		no meio ambiente	Condições
Ácido Clofibríco	Maior metabólito de três agentes reguladores de lipídeos	1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
		0,2-0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Correntes do rio Paraíba do Sul/RJ
Ácido Fenofibríco	Maior metabólito do fenofibrato	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Bezafibrato	Agente regulador de lipídeos	1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Genfibrozila	Agente regulador de lipídeos	$\approx 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Ibuprofeno	Antiinflamatório	$\approx 0,35 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Diclofenaco	Antiinflamatório	$\approx 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
		0,02–0,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Correntes do rio Paraíba do Sul/RJ
Cetoprofeno	Antiinflamatório	$\approx 0,55 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Indometacina	Antiinflamatório	0,95 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ

Fonte: STUMPF *et al.* (1999) *apud* KRAUSE (2009).

Com relação ao processo de remoção por sorção, alguns fármacos ácidos, como os antiinflamatórios ibuprofeno e ácido acetilsalisílico e os reguladores de colesterol ácido

clofibrato e benzafibrato, são carregados negativamente em pH neutro. Isso quer dizer que para todos esses fármacos polares, a sorção no lodo é muito pequena (COELHO, 2008).

Já com relação à degradação biológica, ela apenas será possível tratando-se de fármaco biodegradável (Tabela 3.2) e se houver um outro substrato disponível para a multiplicação microbiana. Isso porque, os fármacos chegam às ETEs em baixíssimas concentrações (COELHO, 2008), sendo insuficientes para proporcionar o crescimento de bactérias que degradam a matéria orgânica. LAJEUNESSE e colaboradores (2012) investigaram o comportamento de quatorze antidepressivos e um anticonvulsivante durante o tratamento de efluentes utilizando cinco tratamentos biológicos diferentes em ETEs no Canadá. As concentrações dos fármacos foram determinadas afluente e efluente das ETES, dos quinze compostos pesquisados, treze foram detectados após o tratamento biológico. Os resultados demonstraram que as ETEs possuíam capacidade moderada na remoção dos compostos e que, portanto, novas tecnologias de tratamento deveriam ser adicionadas aos processos. Outro exemplo é o trabalho de Mascolo e colaboradores (2010), em que os autores concluíram que o ácido nalidíxico, uma quinolona, não poderia ser considerado biodegradável, pois foi observada uma remoção de apenas 40% deste composto quando utilizado tratamento biológico aeróbio.

Outra variável importante é a idade do lodo, que interfere na afinidade entre a bactéria e o fármaco. Buser; Poiser e Müller (1998) citado por Coelho (2008) mostrou que ibuprofeno, a sulfametoxazol, o benzafibrato e o ácido acetilsalisílico requerem uma idade do lodo entre dois a cinco dias para obter-se uma boa degradação. Para o 17 α -etinilestradiol, o diclofenaco, o iopromida e a roxitromicina é necessário uma idade do lodo de cinco a quinze dias. No caso da carbamazepina e do diazepam não foi observada degradação mesmo com lodo com idade superior a vinte dias.

Tabela 3.2 – Avaliação da biodegradabilidade de alguns fármacos

Fármacos	Biodegradabilidade
Ampicilina	48% biodegradável
Ibuprofeno	biodegradável
Naproxeno	não biodegradável
Sulfametazol	não biodegradável
Tetraciclina	não biodegradável

Fonte: Adaptado de RICHARDSON & BOWRON, 1985 *apud* COELHO, 2008.

3.2.2 Processos Oxidativos Avançados (POAs)

Por serem os fármacos compostos de difícil degradação quando submetidos aos processos convencionais de tratamento biológico, novas tecnologias devem ser inseridas nas ETEs objetivando remover especificamente estes compostos.

Os processos oxidativos avançados (POA) vêm se mostrando eficientes na degradação e remoção de medicamentos, sendo frequentemente empregados na remediação de efluentes industriais, esgotos domésticos, águas de superfície, solos contaminados e lixiviados de aterros sanitários. Embora apresentem desvantagens, como a formação de subprodutos e elevado custo, tratam-se de processos extremamente eficientes para mineralizar substâncias orgânicas de difícil degradação e em baixas concentrações (KRAUSE, 2009). Por esses motivos, esses métodos têm sido muito utilizados no tratamento de efluentes industriais contendo resíduos de fármacos. Na Tabela 3.3 são apresentados alguns trabalhos, recentemente publicados, que utilizaram um ou mais processos oxidativos avançados para degradar fármacos.

Tabela 3.3 – Relação de trabalhos que utilizam POAs para tratarem fármacos

Fármaco	POA	Referência
Ácido Mefenâmico	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
	O ₃ /UV	Chang <i>et al</i> , 2012
Amoxicilina	UV/TiO ₂ , UV/H ₂ O ₂ /TiO ₂	Elmolla e Chaudhuri, 2010
	UV, UV/H ₂ O ₂	Jung <i>et al</i> , 2012
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ /UV	Elmolla <i>et al</i> , 2011
Bezafibrato	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
	TiO ₂ /UV	Lambropoulou <i>et al</i> , 2006
Carbamazepina	Fe ³⁺ , FeO _x /H ₂ O ₂ /UV, Solar	Trovó <i>et al</i> , 2008
	O ₃ , O ₃ /UV, H ₂ O ₂ /UV	Gerbhard <i>et al</i> , 2007
	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
Ciprofloxacino	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Li <i>et al</i> , 2012
	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ /UV	Bobu <i>et al</i> , 2008
Citalopram	O ₃	Liu <i>et al</i> , 2012 e De Witte <i>et al</i> , 2009
	UV, O ₃ , Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Hösing <i>et al</i> , 2012
Diazepam	O ₃ , O ₃ /UV, H ₂ O ₂ /UV	Gerbhard <i>et al</i> , 2007
	Fe ₂ O ₃ /H ₂ O ₂ /UV	Valcárcel <i>et al</i> , 2012
Diclofenaco	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Li <i>et al</i> , 2012
	O ₃ , O ₃ /UV, H ₂ O ₂ /UV	Gerbhard <i>et al</i> , 2007
	O ₃ /UV/TiO ₂	Aguinaco <i>et al</i> , 2012
	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
Fluoxetina	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Li <i>et al</i> , 2012
	O ₃ , TiO ₂ , O ₃ /H ₂ O ₂ , TiO ₂ /O ₃ /H ₂ O ₂	Méndez-Arriaga <i>et al</i> , 2011
17 α-Etinilestradiol	O ₃	Larcher <i>et al</i> , 2012
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ /UV	Frontistis <i>et al</i> , 2011
Ibuprofeno	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Li <i>et al</i> , 2012
Iopromida	O ₃	Huber <i>et al</i> , 2005
	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
Naproxeno	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Li <i>et al</i> , 2012
	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
Norfloxacino	UV, UV/H ₂ O ₂	Cruz <i>et al</i> , 2012
	Bi ₂ WO ₆ /Solar	Chen e Chu, 2012
	TiO ₂ /UV	Chen <i>et al</i> , 2012
Pacetamol	O ₃	Liu <i>et al</i> , 2012
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ /UV	Trovó <i>et al</i> , 2012
	Fe ³⁺ , FeO _x /H ₂ O ₂ /UV, Solar	Trovó <i>et al</i> , 2008
Sulfametazol	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Li <i>et al</i> , 2012
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ /UV	González <i>et al</i> , 2007
Tetraciclina	TiO ₂ /UV	Mboula <i>et al</i> , 2012
	Fe ³⁺ , FeO _x /H ₂ O ₂ /UV, Solar	Bautitz <i>et al</i> , 2007

3.2.2.1 Utilização de peróxido de hidrogênio como oxidante

O peróxido de hidrogênio pode ser utilizado no tratamento de efluentes que requerem condições de oxidação menos severas. O maior potencial de oxidação é observado em condições ácidas, variando de 1,80 para 0,87 V quando o pH muda de 0 para 14 (NEYENS & BAEYENS, 2003). Contudo, observa-se que em faixas de pH muito ácidas ($\text{pH} < 2$), o peróxido de hidrogênio apresenta instabilidade (CRUZ *et al*, 2000).

A utilização de peróxido de hidrogênio individualmente para degradar fármacos não é muito reportada na literatura, isso devido à elevada estabilidade destes compostos, o que dificulta sua efetiva remoção. Nesse sentido, a literatura reporta uma série de trabalhos onde o peróxido de hidrogênio é utilizado de forma combinada com outros processos.

3.2.2.2 Fotólise e fotólise associada ao peróxido de hidrogênio

O espectro de radiação ultravioleta pode ser dividido em três faixas distintas: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-C (100-280 nm). Tanto radiações UV-A quanto UV-C são amplamente utilizadas para aplicações ambientais. A maioria das lâmpadas UV-A têm seu pico de emissão em 365 nm e, algumas, em 350 nm. A radiação UV-C, também chamada de radiação de ondas curtas, é usada para desinfecção de águas e efluentes. O espectro da radiação emitido por lâmpadas de mercúrio de baixa pressão, usadas para fins de desinfecção, tem pico de emissão em torno de 254 nm (CASTRO, 2004).

A radiação UV, quando utilizada isoladamente, leva a uma decomposição lenta do composto orgânico, exceto nos casos em que a molécula é fotossensível. Esse é o motivo pelo qual usa-se frequentemente processos combinados a essa radiação, e não ela individualmente.

A combinação da radiação UV com peróxido de hidrogênio tem demonstrado ser eficiente na remoção de compostos em baixas concentrações. Segundo DOMÉNECH e colaboradores (2001) a utilização da irradiação UV promove a quebra homolítica da molécula de H_2O_2 , produzindo radicais hidroxilas. A formação destes radicais é fortemente dependente do pH, apresentando um maior rendimento em pH ácido.

De acordo com MELO *et al* (2009) a aplicação da fotólise de H₂O₂ para degradação de baixas concentrações de fármacos encontrados em águas e efluentes de ETEs pode ser efetiva sem a necessidade de utilização de altas concentrações do oxidante.

A degradação de fármacos como carbamazepina (VOGNA *et al*, 2004a), diclofenaco (VOGNA *et al*, 2004b) e paracetamol (ANDREOZZI *et al*, 2003) foi estudada em concentrações que variaram de 1,51 a 296 mg L⁻¹ com a utilização da combinação H₂O₂/UV. Observou-se uma degradação total desses fármacos e remoção de até 40% de carbono orgânico total (COT) entre 5 e 90 min de reação.

JUNG e colaboradores (2012) avaliaram a remoção de amoxicilina e consequente eliminação da atividade antimicrobiana pelos processos de radiação UV e UV/H₂O₂. Observou-se que a mineralização da amoxicilina com utilização de radiação UV foi pouco significativa, sendo acelerada com a adição de pequenas doses de H₂O₂. A total mineralização da amoxicilina não foi observada para nenhum dos processos. A atividade antimicrobiana permaneceu após tratamento, o que foi confirmado pela presença de metabólitos que possuíam anel β-lactâmico.

CRUZ e colaboradores (2012) estudaram a remoção compostos classificados como poluentes emergentes após tratamento por lodos ativados. Foram monitorados trinta e sete compostos, dos quais trinta e dois foram detectados após tratamento biológico secundário. Avaliou-se a remoção destes compostos por UV (254nm), Fenton e foto-Fenton. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 3.4.

Os estudos de CRUZ e colaboradores (2012) demonstraram que a utilização do processo combinado UV/H₂O₂ pode ser efetivo na remoção de uma série de compostos, podendo ser utilizado como pós tratamento para tratamentos biológicos.

Tabela 3.4 – Compostos encontrados após tratamento biológico; limite de quantificação e % de remoção por UV, UV/H₂O₂

Familia/Função	Substância	LDQ ng/L	Concentração após	UV ₂₅₄	UV+H ₂ O ₂ (50	UV+H ₂ O ₂ (50		
			tratamento secundário					
			(ng/L)	10min	mg/L) 10 min	mg/L) 30 min		
Fármacos	Reguladores lipídicos	Bezafibrato	8	426	24	75	100	
		Gemfibrozil	2	25	18	75	100	
		Sinvastatina	15	nd	nd	nd	nd	
	Antidiabético	Metformina	15	1027	6	34	11	
	Antiepiléptico	Carbamazepina	9	263	23	75	100	
		Gabapetina	7	1737	10	53	99	
		Diclofenaco	15	518	100	100	100	
	Analgésicos	Ibuprofeno	15	112	34	100	100	
		Cetoprofeno	10	123	100	100	100	
		Ácido Mefenâmico	15	291	100	100	100	
		Naproxeno	30	178	62	100	100	
		Paracetamol	50	nd	nd	nd	nd	
		Primidona	5	49	5	65	100	
		Atenolol	7	669	20	58	100	
		β-Bloquadores	Metoprolol	5	179	14	73	100
			Sotalol	5	260	86	100	100
		Antibióticos	Azitromicina	40	295	0	50	100
	Ciprofloxacino		15	129	48	69	100	
	Claritromicina		3	518	0	56	100	
	Metronidazol		50	456	24	52	100	
	Norfloxacino		15	27	36	100	100	
	Ofloxacino		15	41	65	100	100	
	Sulfametoxazol		5	578	51	98	100	
	Trimetoprim		5	131	7	66	100	
	Contraste Raio-X		Iopamidol	240	1726	100	100	100
			Iopromida	600	nd	nd	nd	nd
	Inibidores de corrosão	Benzotriazol	19	2781	40	71	100	
		Metilbenzotriazol	10	1535	37	72	100	
	Biocidas/Pesticidas	Biocida	Triclosan	50	135	29	100	100
			Atrazina	4	9	100	100	100
Herbicida		Diuron	40	57	100	100	100	
		Isoproturon	10	nd	nd	nd	nd	
		Mecoprop	5	34	82	100	100	
Algicida		Irgarol	3	nd	nd	nd	nd	
		terbutrina	3	19	74	83	100	

Fonte: Cruz *et al*, 2012.

3.2.2.3 Utilização de reagente de Fenton

O poder oxidante da mistura entre H₂O₂ e sais ferrosos foi descoberto há aproximadamente 100 anos atrás por H. J. H. Fenton, mas sua aplicação como um processo oxidante para destruir compostos orgânicos somente foi iniciada em meados de 1960 (NEYENS & BAEYENS, 2003).

A reação de Fenton está baseada na geração de radicais hidroxilas através da decomposição do H₂O₂ catalisada por Fe²⁺ em meio ácido, Equação (3.1).



O mecanismo de reação envolvendo o peróxido de hidrogênio é complexo, podendo mudar de acordo com as condições do meio de reação e do tipo de catalisador utilizado (KANG e HWANG, 2000). As equações 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 mostram de forma simplificada o mecanismo de reação de decomposição catalítica do H₂O₂ por sais de ferro, em meio ácido.



O reagente de Fenton tem sido amplamente utilizado para tratar efluentes que possuam compostos recalcitrantes. Dentre as vantagens deste tratamento, cita-se o baixo custo operacional atrelado a uma alta eficiência na remoção de compostos orgânicos.

LIU e colaboradores (2012) e AHMAD e colaboradores (2005) demonstram que reações realizadas em pH próximos de 3 apresentam maiores eficiências na degradação da matéria orgânica através do sistema Fenton homogêneo. Ao final do processo, na etapa de neutralização, ocorre a formação de quantidade significativa de lama. Essa característica associada à adsorção de contaminantes na lama, são uma das principais desvantagens deste processo, pois dependendo da concentração de ferro e do volume de efluente tratado, torna-se obrigatória uma etapa de separação de sólidos ao final do tratamento (CRUZ, 2000).

BAE e colaboradores (2013) relataram que o anti-inflamatório diclofenaco de potássio pode ser rapidamente degradado quando se utiliza a oxidação proposta por Fenton. Durante os ensaios foram realizados testes utilizando ou a oxidação tradicional ou o mineral pirita como fonte de ferro. Com a utilização da pirita observou-se completa degradação do diclofenaco, em 120 segundos de reação. A oxidação tradicional resultou em 65% de degradação em 180 segundos de reação, o que sugere que a reação de Fenton pode ser melhorada através da liberação contínua de Fe²⁺ para o meio reacional, proporcionada pelas reações que aconteceram na superfície do mineral.

3.2.2.4 Utilização de foto-Fenton

Este processo, que combina a aplicação de radiação ultravioleta a uma reação de Fenton, pode produzir uma maior eficiência de degradação, já que a fotólise do peróxido de hidrogênio acelera a formação dos radicais $\cdot\text{OH}$.

Em comparação com Fenton, o processo foto-Fenton tende a ser mais efetivo na degradação de poluentes devido à aceleração na produção de radicais hidroxilas e em função de uma menor produção de lama, o que torna o processo mais atrativo e viável economicamente.

O efluente de uma indústria farmacêutica de formulação de penicilina foi estudado por processo Fenton modificado ($\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$) e foto-Fenton modificado ($\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$). Os resultados encontrados utilizando-se condições ótimas de trabalho ($[\text{Fe}^{3+}] = 1,5 \text{ mM}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 25 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3,0$) demonstraram uma remoção de 56% de DQO e 42% de COT em um tempo reacional de 30 minutos no processo foto-Fenton modificado. Em contrapartida, a eficiência de remoção no processo Fenton modificado foi limitada a 44% de DQO e 35% de COT para o mesmo período de tratamento. Com relação à biodegradabilidade do efluente, observou-se um aumento de 10% para 24% após o tratamento por Fenton modificado (ARSLAN-ALATON *et al.*, 2004).

RIVAS e colaboradores (2010) estudaram a degradação do disruptor endócrino metoprolol por diversos processos oxidativos avançados. Os autores observaram que a taxa de degradação e mineralização foi melhorada através da adição de promotores de radicais hidroxilas, quando se utilizava sistema de radiação UV. O processo foto-Fenton, quando otimizado, apresentou mineralização de 70%, tendo sido o mais eficiente.

3.3 Testes ecotoxicológicos

O século XIX foi marcado pela segunda revolução industrial, distinta pelo notável crescimento da indústria química, petroquímica e metalomecânica, o que permitiu uma considerável atuação antrópica nas paisagens e no meio ambiente, perdurando até os dias atuais. A quantidade de substâncias químicas que passaram a compor a atmosfera, a água e o solo interferiram e interferem de modo crucial nos ecossistemas terrestres, sendo hodiernamente um dos assuntos mais debatidos na esfera pública, aliados a um considerável

aumento populacional e acidentes industriais de repercussão internacional. Esse é o contexto que permitiu o chamado monitoramento ambiental, de onde advém a ecotoxicologia.

O termo foi cunhado no ano de 1969 pelo francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977), durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo. Por ecotoxicologia, entende-se "ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado" (PLAA; HEWITT, 1982).

Nesse sentido, os testes ecotoxicológicos são métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos danosos em organismos vivos.

Nos países da União Europeia, há normas que já exigem análises de ecotoxicidade para o monitoramento ambiental. Amplamente utilizado para diversos fins, esses testes levam em consideração o sinergismo ou antagonismo entre substâncias químicas, mensurando seus respectivos efeitos nos mais diversos ecossistemas (SILVA *et al*, 2011).

3.3.1 Tipos de testes ecotoxicológicos

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. Esses testes diferem na duração e nas respostas finais avaliadas.

3.3.1.1 Teste de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos a um estímulo que se manifesta, em geral, em um intervalo de 0 a 96 h (RAND; PATROCELLI, 1985). Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade aguda incluem qualquer resposta exibida por um organismo-teste ou população resultante de um estímulo químico. Normalmente, o efeito observado é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade (COSTA *et al*, 2008).

A avaliação ecotoxicológica aguda constitui-se, geralmente, uma abordagem exploratória para evidenciar um problema de qualidade de corpos hídricos que recebem despejos industriais ou

domésticos (BERTOLETTI; ZAGATO, 2006 *apud* MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Esse tipo de teste também pode ser aplicado para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para um determinado agente tóxico isolado e as concentrações seguras de agentes químicos para preservação da vida aquática e do ambiente (RASGALLA JR *et al*, 2002 *apud* MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). São objetivos de testes de toxicidade aguda identificar a variabilidade das respostas ao agente entre as diferentes espécies, identificar a toxicidade comparativa e detectar contaminações agudas. De acordo com Magalhães e Ferrão Filho (2008), no Brasil, esses testes vem sendo empregados com o intuito de minimizar o impacto ambiental, avaliar a eficiência de estações de tratamento, bem como requisito para obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de alguns estados.

Os testes de toxicidade aguda permitem que sejam determinados por métodos estatísticos, valores de Concentração Efetiva Média (CE₅₀) e Concentração Letal Média (CL₅₀) (Tabela 3.5). Geralmente, os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos, uma vez que estas respostas são de fácil reprodução, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA *et al*, 2008).

Tabela 3.5 – Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade

PARÂMETRO	DEFINIÇÃO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
DL ₅₀	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96 h
CL ₅₀	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96 h
CE ₅₀	Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 ou 48 h
CENO	Concentração de Efeito Não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias

Fonte: COSTA *et al*, 2008

Exemplo da relevância de estudos de toxicidade aguda para a área de contaminação de efluentes foi verificado por Yoshimura e Endoh (2005), em que a toxicidade aguda de cinco fármacos (bitionol, pirimetamina, cloridrato de levamisol, cloridrato de ambroxol e triclorfon), empregados no campo da medicina veterinária, foi testada em *Oryzias latipes*, *Daphnia magna* e *Brachionus calyciflorus*. O objetivo do trabalho foi determinar a 24, 48, 72 e 96 h CL₅₀ para os três organismos, além dos valores de 24 e 48 h CE₅₀ para *D. magna* e 24 h CE₅₀ para *B. calyciflorus*. Dentre os fármacos pesquisados, o bitionol seguido pela pirimetamina foram os mais tóxicos e o cloridrato de ambroxol mostrou-se o menos nocivo. A exceção foi o resultado obtido com o crustáceo *D. magna*, que é mais sensível ao triclorfon.

3.3.1.2 Teste de toxicidade crônica

Testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger de 1/10 a todo o ciclo de vida do organismo-teste. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles (COSTA *et al*, 2008). Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação.

Os testes de toxicidade crônica dependem diretamente dos resultados de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir do CL₅₀. Comparado aos testes agudos, esses testes são mais sensíveis à elevada diluição esperada em amostras ambientais (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). São, portanto, comumente utilizados quando os testes de toxicidade aguda são insuficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável.

Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como Concentração de Efeito Não observado (CENO) ou Concentração de Efeito Observado (CEO) (Tabela 3.5), mas também podem ser expressos como Concentração Efetiva Média (CE₅₀).

Alguns trabalhos evidenciam a importância de realização de testes de toxicidade crônica em complementação aos de toxicidade aguda ao verificarem que, embora antibióticos em corpos d'água afetem pouco a bioluminescência de *Aliivibrio fischeri* e *Aliivibrio harveyi* em testes produzidos em curto espaço de tempo, são capazes de trazer efeitos danosos significativos na reprodução desses indivíduos em testes realizados em maior intervalo de tempo (THOMULKA e MCGEE, 1993; BACKHAUS e GRIMME, 1999).

3.3.2 Escolha do organismo-teste

Observa-se que é corrente o uso de mais de um organismo nos testes ecotoxicológicos, com o intuito de se avaliar a cadeia alimentar do modo menos fragmentado possível. (SILVA *et al*,

2011; KÜSTER; DORUSCH; ALTENBURGER, 2005; MARQUES, 2011; MACKEN *et al*, 2009; PARK *et al*, 2005; MANFRA, 2007; KUNGOLOS *et al*, 2004; PALMA *et al*, 2008).

Em geral, esses testes são realizados com espécies de microcrustáceos (sendo comum as espécies do gênero *Daphnia*), decompositores (igualmente comum a bactéria *Aliivibrio fischeri*) e, em alguns casos, espécies de algas ou animais.

A escolha do organismo que testa a ecotoxicidade é de extrema importância, uma vez que a ausência de resposta de uma determinada espécie a certa substância pode traduzir apenas uma resistência específica, ainda que a substância em questão seja tóxica ou danosa ao ambiente analisado.

Magalhães e Ferrão Filho (2008) citando Rand e Petrocelli (1985) afirmam que, para a escolha do organismo teste, diversos critérios devem ser observados: abundância e disponibilidade, significativa representação ecológica na biocenose, cosmopolitismo da espécie, conhecimento prévio de sua fisiologia, biologia e hábitos, estabilidade genética e uniformidade populacional, sazonalidade, sensibilidade constante e apurada, importância comercial e facilidade de cultivo em laboratório. Esses quesitos dificultam a existência de um arquétipo ideal para exames toxicológicos. Portanto, exige-se uma padronização de espécies para cada ecossistema em estudo e, ademais, não se eximiria o uso de espécies encontradas no próprio ecossistema (espécies nativas). Os autores, ainda, observando o problema da inexistência de uma espécie que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema, recomendam utilizar três exemplares de diferentes níveis tróficos, aumentando a probabilidade de respostas tóxicas diferenciadas, através de organismos de maior ou menor sensibilidade a certas substâncias.

Exemplo dessa recomendação foi verificado por Palma e colaboradores (2008), que avaliaram a toxicidade aguda de pesticidas na região do Alentejo, em Portugal. Os resultados indicaram que a resposta a um determinado composto é fortemente dependente da sensibilidade àquela mesma substância. Também constatou-se que as bactérias são notadamente menos resistentes a herbicidas e inseticidas do que crustáceos. Além disso, notou-se como algumas espécies - no caso, o crustáceo *Thamnocephalus platyurus* -, apresentam melhores resultados em

determinados exames, a despeito de espécies já amplamente utilizadas e divulgadas no meio científico, como *Daphnia magna*, *Daphnia carinata* e *Aliivibrio fischeri*.

Nesse mesmo sentido, Silva e colaboradores (2011) avaliaram a toxicidade de resíduos industriais que passaram pelo tratamento de estabilização-solidificação. Os testes com *Daphnia magna* mostraram-se mais sensíveis do que aqueles com o *Aliivibrio fischeri*, sendo ambos mais sensíveis que as algas do gênero *Scenedesmus subspicatus*.

Vale ressaltar que a seleção razoável de espécies, além da adequação e da melhor precisão, permite que se encontre novas alternativas para organismos em franco uso nos testes ecotoxicológicos que, notadamente, são de difícil cultivo. É o caso do *T. platyrus*, alternativa à *D. magna* em análises de certas substâncias encontradas em ambientes impactados, como os pesticidas atrazina, sulfato de endosulfan e clorpirifo (PALMA *et al.*, 2008) e certos metais traços, como zinco, cobre e dióxido de titânio (HEINLAAN *et al.*, 2008 *apud* PALMA *et al.*, 2008).

3.3.2.1 Teste de toxicidade com *Aliivibrio fischeri*

O teste de toxicidade aguda por *Aliivibrio fischeri* é considerado uma alternativa eficiente devido à correlação que apresenta com outros bioensaios que utilizam peixes e invertebrados, e pela rapidez de obtenção de resultados (KAISER, 1998). Estudos de correlação entre resultados de toxicidade com *Aliivibrio fischeri* e outros organismos aquáticos, inclusive de água doce, são bastantes numerosos, o que proporciona maior confiança na utilização desse microorganismo em testes ecotoxicológicos (KAISER e PALABRICA, 1991; MUNKTTRICK *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 1993; KAISER *et al.* 1994). Foram esses os motivos que levaram a escolha do citado organismo para a realização dessa pesquisa.

Exemplo de pesquisa que utilizou análise com *Aliivibrio fischeri* e obteve sucesso é a de Białk-Bielin´ska e colaboradores (2011), em que avaliou-se a toxicidade de doze sulfonamidas, buscando comparar a sensibilidade da bactéria marinha luminescente com a de outros organismos, tais como algas e plantas. Nesse estudo, verificou-se que os organismos *Lemna minor* e *Scenedesmus vacuolatus* são os mais sensíveis à contaminação por esse tipo de fármaco.

Outro trabalho que utiliza de forma exitosa a bactéria *Aliivibrio fischeri* é o de Kim e colaboradores (2007), em que os quatro fármacos mais utilizados na Coreia – acetaminofeno, carbamazepina, diltiazem e outras seis sulfonamidas – tem toxicidade testada para *Aliivibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Oryzias latipes*. Dentre esses organismos, o mais sensível a contaminação pelos fármacos supracitados foi a *Daphnia magna*.

3.3.3 Relação dose-resposta

A relação entre a concentração de uma substância química à qual é exposto um determinado organismo e o efeito nocivo que lhe é produzido, conhecida como relação dose-resposta, é um dos aspectos mais importantes da ecotoxicologia aquática. A relação dose-resposta constitui a base fundamental para a avaliação do risco gerado pelas substâncias químicas no meio ambiente, porque permite quantificar a toxicidade aguda dessas substâncias. Com menos frequência, a expressão dose-efeito pode ser empregada. No entanto, em toxicologia os termos “efeito” e “resposta” se diferenciam (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Utiliza-se o termo “efeito” para denominar uma alteração biológica e o termo “resposta” para indicar a proporção de uma população que manifesta um efeito definido.

Em geral, as curvas que representam a relação dose-resposta apresentam comportamento não-retilíneo do tipo sigmóide (Figura 3.5). Dois parâmetros importantes podem ser determinados a partir das curvas dose-resposta: a concentração ou dose, que resulta em 50% do efeito medido, ou seja, os valores de CL_{50} ou CE_{50} e o coeficiente angular da porção linear da curva que passa pelo ponto correspondente à CL_{50} ou CE_{50} (COSTA *et al*, 2008). Os dois parâmetros são necessários para descrever precisamente a relação entre a concentração do agente químico e o efeito deletério provocado nos organismos-teste. Ainda de acordo com COSTA *et al* (2008), diferentes substâncias químicas podem apresentar diferentes valores de CL_{50} ou CE_{50} , mas podem apresentar os mesmos valores de coeficientes angulares. Valores similares de coeficientes angulares podem indicar que os modos de ação das substâncias químicas analisadas são similares.

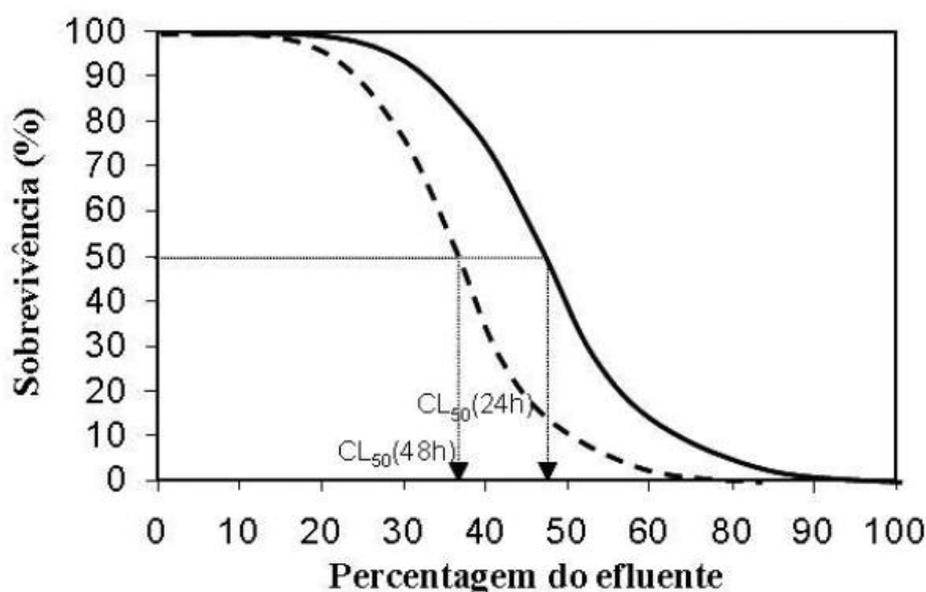


Figura 3.5 – Curva de dose-resposta hipotética para um efluente qualquer. A concentração do efluente é dada pela porcentagem de diluição da amostra do efluente na solução-teste. A linha contínua representa a resposta nas primeiras 24 horas e a linha pontilhada após 48 horas de exposição

Fonte: MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008

Uma forma de explicar variações de configuração em uma curva dose-resposta é dizer que cada indivíduo de uma população tem uma tolerância própria e requer uma determinada dose antes de responder com um efeito. Pode-se reconhecer uma região inicial, onde o efeito não se apresenta, seguida de uma região intermediária, onde os efeitos desenvolvem-se rapidamente e uma região final, onde o efeito diminui assintoticamente.

Costa e colaboradores (2008) citando Yu (2005) esclarecem que um importante problema refletido nos valores CL_{50} e CE_{50} é que expressam concentrações ambientais de substâncias tóxicas referentes a um determinado tempo de exposição, estabelecido para cada teste. Assim, uma substância que se move lentamente nos tecidos, por exemplo, pode apresentar uma toxicidade menor no período do teste, simplesmente pelo fato de sua concentração no tecido alvo não ter atingido níveis suficientes para provocar efeito tóxico durante o intervalo de tempo considerado.

3.4 Ensaios ecotoxicológicos: aspectos legislados e práticas vigentes

Ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos fazem parte das exigências da legislação federal e estadual na avaliação da qualidade ambiental visando à preservação da vida aquática. Estes ensaios também são utilizados no controle do lançamento de efluentes

industriais e de materiais dragados, tanto em ambientes marinho, estuarino ou de água doce, para assegurar a manutenção das condições e padrões de qualidade previamente estabelecidos para um determinado corpo d'água.

3.4.1 Aspectos legislativos

A Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. A Resolução estabelece em seu artigo 34, parágrafo 1º, que efluentes líquidos não devem causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos para organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental. Ainda no artigo 34, parágrafo 2º esclarece-se que os critérios de toxicidade previstos no parágrafo 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente. No entanto, de acordo com o parágrafo 3º, nos corpos de água em que as condições e padrões de qualidade previstos na Resolução não incluem restrições de toxicidade a organismos aquáticos, não se aplicam as exigências anteriormente mencionadas. Esta resolução faz uso dos ensaios ecotoxicológicos, portanto, para o estabelecimento de critérios de toxicidade para os corpos d'água, de forma a garantir a preservação da biodiversidade dos corpos hídricos quando do lançamento de efluentes.

Vale mencionar que a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA, não aborda a questão dos testes ecotoxicológicos.

Para atender as exigências da legislação federal, o estado de Minas Gerais estabeleceu a Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Essa Deliberação ratifica o estabelecido no artigo 34 da Resolução CONAMA 357/05 e, ainda, acrescenta em seu artigo 7, parágrafo 4º que as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes listados ou não nesta Deliberação Normativa, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas, utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, análises de bioacumulação e efeitos endócrinos ou outros

métodos cientificamente reconhecidos. Isso significa que, além do que já estava previsto na Resolução CONAMA 357/05, o estado de Minas Gerais exige a realização de testes ecotoxicológicos em efluentes, objetivando garantir que não haverá prejuízo ao ecossistema.

Ainda nesse sentido, existem as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Fundada em 1940, a ABNT é o órgão responsável pela normalização e padronização técnica no país, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico brasileiro. A utilização de testes padronizados é vantajosa, principalmente, por permitir a reprodução de análises, além da seleção de um ou mais testes uniformes e úteis para uma variedade de laboratórios, facilitando a comparação dos dados e contribuindo para aumentar a utilização dos dados publicados (COSTA *et al*, 2008). A ABNT possui doze normas tratando a respeito dos testes ecotoxicológicos, buscando estabelecer critérios para seleção de organismos-teste, bem como de amostragem e análise de resultados (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Normas da ABNT que normalizam a realização de teste ecotoxicológicos

NORMAS DA ABNT PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	
ABNT. NBR 15469: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras.	ABNT NBR 15088:2011 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes
ABNT NBR 13373:2010 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)	ABNT NBR 12713:2009 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)
ABNT NBR 15499:2007 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes	ABNT NBR 15470:2007 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade em sedimento - Método de ensaio com Hyalella spp (Amphipoda)
ABNT NBR 15411-1:2006 Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de vibrio fischeri (ensaio de bactéria luminescente)	ABNT NBR 15411-2:2006 Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz Vibrio fischeri (ensaio de bactéria luminescente)
ABNT NBR 15411-3:2006 Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio fischeri (Ensaio de bactéria luminescente)	ABNT NBR 15350:2006 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)
ABNT NBR 15308:2005 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (crustacea)	ABNT NBR 12648:2005 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)

A tabela permite observar que os testes com os peixes, *Ceriodaphnia sp.*, *Daphnia sp.*, *Hyaella sp.*, *Aliivibrio fischeri*, *Echinodermata*, *Chlorophyceae* e *Misdáceos* são regulamentados e, portanto, pode-se utilizar esses indivíduos como organismos-teste.

3.4.2 Práticas vigentes

Para atender aos requisitos da legislação federal, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) utiliza a Resolução da SMA 03/2000 na elaboração de seus manuais relacionados à ecotoxicologia (BERTOLETTI, 2009). Os manuais da CETESB (Tabela 3.7) fornecem informações que funcionam como um guia para realização de procedimentos que o órgão ambiental do estado de São Paulo julga mais adequados. Por esse motivo, esses documentos são indicativos das práticas usualmente empregadas e importantes para delimitação de uma metodologia mais adequada para realização de teste ecotoxicológicos.

Tabela 3.7 – Manuais CETESB para padronização de testes ecotoxicológicos

Norma	Identificação
L5.018	Testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (<i>Cladocera</i> , <i>Crustacea</i>)
L5.019	Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte I: Sistema Estático. Parte II: Sistema Semi-estático. Parte III: Sistema de Fluxo Contínuo.
L5.020	Teste de toxicidade com <i>Chlororella vulgaris</i> (<i>Chlorophyceae</i>)
L5.022	Avaliação de toxicidade crônica utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1984 (<i>Cladocera</i> , <i>Crustacea</i>)
Manuais CETESB L5.227	Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Photobacterium phosphoreum</i> (Sistema Microtox)
L5.228	Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i>
L5.250	Água do Mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com <i>Lytechinus variegatus</i> Lamarck, 1816 (<i>Echinodermata</i> , <i>Echinoidea</i>)
L5.251	Água do Mar - Teste de toxicidade aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> Silva, 1979 (<i>Mysidacea</i> , <i>Crustacea</i>)

Fonte: Adaptado de MAGALHÃES & FERRÃO FILHO (2008)

Para corpos de água doce, a CETESB recomenda a realização simultânea dos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*. No caso de reavaliação do limite de toxicidade, além dos dois ensaios já citados, sugere-se o ensaio crônico com uma espécie de peixe (BERTOLETTI, 2009).

Ainda de acordo com Bertoletti (2009), para efluentes lançados em ambientes marinhos ou estuarinos, a CETESB recomenda a execução simultânea dos ensaios de ecotoxicidade aguda com misidáceos ou *Aliivibrio fisheri* e do ensaio de ecotoxicidade crônica com ouriço-do-mar. Na reavaliação do limite de toxicidade de corpos d'água, devem ser apresentados os resultados dos três ensaios anteriormente citados.

Além disso, a CETESB não recomenda o congelamento de amostras. Embora exista a indicação de congelamento na norma ABNT para amostras que não podem ser processadas em até 48h após a coleta, os manuais USEPA (2002 a,b), no item específico referente à preservação de amostras de efluente, orientam a realização do ensaio com amostra fresca em até 36h após a coleta e que, em nenhum caso, o intervalo entre a coleta e a primeira utilização da amostra deve ultrapassar 72 horas. Dados de literatura mostram que os componentes de resíduos sólidos (filtráveis e não filtráveis) da amostra se alteram com o congelamento e descongelamento (USEPA, 1982). Desta forma, quando não se conhece a interferência do congelamento na amostra (efluente ou água superficial) recomenda-se que seja adotado a refrigeração, considerado o melhor procedimento de preservação, uma vez que pouco altera as características da amostra.

Finalmente, com relação à apresentação de relatório de ensaios ecotoxicológicos, a CETESB exige que esteja acompanhado de selo do INMETRO (ou Declaração de Responsabilidade), devendo ser anexada a carta controle atualizada da sensibilidade dos organismos-teste, bem como o resultado do teste com substância de referência realizado na época dos ensaios das respectivas amostras. Devem, ainda, serem apresentados os valores, iniciais e finais, de pH e oxigênio dissolvido (BERTOLETTI, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho está inserido em um grupo de pesquisa com foco na remoção de fármacos (SIGERS) no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG. Os frutos do trabalho desse grupo encontram-se citados no Apêndice A. Esclarece-se que o foco dessa dissertação foram os testes ecotoxicológicos, uma vez que a seleção dos fármacos e otimização dos diversos tipos de tratamento fazem parte da tese da doutoranda Lucilaine Valéria de Souza Santos, que ainda está em andamento. Salienta-se, portanto, que parte dos métodos e resultados, que serão apresentados a seguir, correlacionam-se a esse trabalho, mas foram elaborados e gerados pela citada pesquisadora.

4.1 *Materiais*

Os antibióticos selecionados para esse estudo foram o norfloxacino, que pertence a classe das fluoroquinolonas, e o sulfato de gentamicina, representante dos aminoglicosídeos. Os fármacos foram selecionados com base em seu uso e ocorrência no ambiente aquático.

A pureza do norfloxacino utilizado é $\geq 98\%$ (USP), que é a mesma que a do sulfato de gentamicina (Henrifarma). As soluções contendo os fármacos foram preparadas em água Milli-Q altamente pura a uma concentração de 15 mg/L de norfloxacino e 100 mg/L de sulfato de gentamicina. As elevadas concentrações selecionadas devem-se aos limites de detecção dos equipamentos com os quais essa pesquisa foi realizada. No caso do norfloxacino, 15mg/L é a solubilidade máxima do antibiótico em água.

O monitoramento da concentração do norfloxacino foi realizado através do Analisador de Carbono Orgânico Total (COT), marca Shimadzu, modelo TOC-V_{CPN}, com amostrador automático ASI-V e UV/VIS Perkin Elmer Lambda XL. Já o sulfato de gentamicina, somente foi monitorado através da concentração COT, devido à escassez de grupo cromóforos na molécula deste aminoglicosídeo.

Outros químicos utilizados para o desenvolvimento dessa pesquisa, citados a frente, foram adquiridos da Merck, Carlo Erba, Fluka e SDI, sendo selecionados os de maior pureza disponível no mercado

4.2 Métodos

4.2.1 Teste ecotoxicológico

Após a preparação das soluções com os antibióticos supracitados, as amostras passaram por análise ecotoxicológica. Essas amostras foram, ainda, submetidas a diferentes tipos de tratamentos (descritos a seguir) e, ao fim desses processos, foram novamente testadas em análise ecotoxicológica, de forma a estabelecer-se uma comparação entre as amostras brutas e tratadas.

O teste ecotoxicológico agudo foi realizado com a bactéria marinha luminescente *Aliivibrio fischeri*, antiga *Vibrio fischeri* (URBANCZYC *et al.*, 2007), utilizando o equipamento MICROTOX[®] modelo 500 Analyzer (SDI). Os testes foram realizados de acordo com a norma ABNT NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio Fischeri* (ensaio de bactéria luminescente) e seguindo o protocolo estabelecido pelo *software* (MICROTOX[®] Omni Software, versão 4.1) do próprio equipamento MICROTOX[®]. As bactérias liofilizadas utilizadas foram, igualmente, obtidas da SDI e ficaram armazenadas na temperatura de -20°C (Figura 4.1). Cada ampola de bactéria contém uma cultura de 10⁸ células. A toxicidade aguda (CE₅₀) foi determinada a partir de nove diluições, em medições da luminescência da bactéria nos tempos 5, 15 e 30 minutos. Para determinar o efeito tóxico, o *software* realiza comparação, em função da luz emitida, entre a amostra em suas diversas diluições e a solução controle. Quanto menos luz emitida, maior a toxicidade da amostra. Logo, a toxicidade relativa da amostra é expressa como a porcentagem de inibição comparada ao controle (STOLTE *et al.*, 2012).

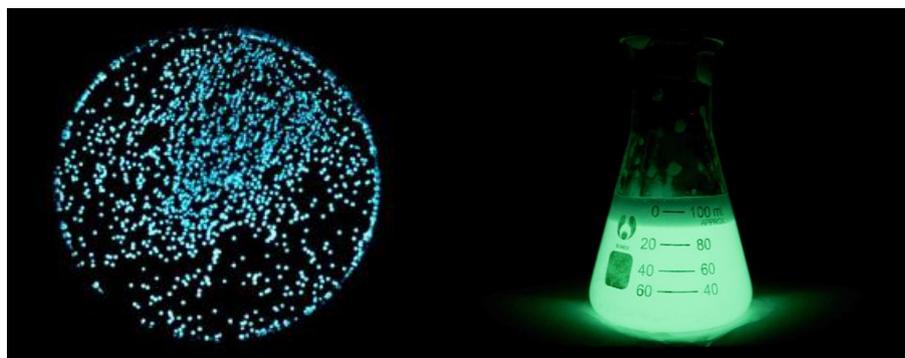


Figura 4.1 – Bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* exibindo potencial de luminescência

Antes da realização dos ensaios, as amostras foram submetidas a ajuste de pH para 6,0-8,5 com HCl ou NaOH e diluição com solução NaCl 2%, chamada diluente. Em função dessas

diluições, a concentração máxima inicial do ensaio definitivo foi 81,9%, de acordo com o demonstrado por Fulladosa *et al.* (2005) e Higa (2008).

Buscando padronizar e garantir a veracidade e uniformidade das análises, a norma NBR 15411-3 (ABNT, 2006) estabelece a necessidade de realização de teste de sensibilidade com cada frasco de bactéria utilizado. Ou seja, antes de iniciar os ensaios com as amostras de interesse, faz-se necessário garantir que as bactérias com as quais se está trabalhando gerarão resultados confiáveis. Esse teste de sensibilidade é realizado com a substância de referência sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Os ensaios de sensibilidade apresentam valores de efeito gama e porcentagem de inibição de luz da bactéria; a NBR 15411-3 (ABNT, 2006) estabelece que o gama precisa estar entre 0,6 e 1,8 no controle, e o efeito de inibição entre 20 e 80% para a substância de referência. Todas as análises realizadas durante essa pesquisa foram seguidas de testes de sensibilidade com resultados que atenderam a regra descrita.

4.2.2 Tratamento biológico

4.2.2.1 *Amostragem e aclimação da biomassa*

As biomassas utilizadas nas montagens dos reatores de biodegradabilidade foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto Arrudas, localizada na região de Sabará (Minas Gerais). Cada biomassa coletada foi aclimatada por nove semanas, recebendo carga crescente do antibiótico e decrescente de glicose (Tabela 4.1). Durante a aclimação foi monitorada o COT. Além disso, preocupou-se em manter a alimentação com glicose até o final do processo, haja vista a baixa concentração de carbono presente nos fármacos.

Tabela 4.1 – Relação antibiótico/glicose durante o período de aclimação da biomassa

Semana	Antibiótico/Glicose
1ª	1/4
2ª	2/3
3ª	2/3
4ª	3/2
5ª	3/2
6ª	3/2
7ª	4/1
8ª	4/1
9ª	4/1

Para aclimação da biomassa aeróbia foram montados reatores de 2 L utilizando 1000 mL de lodo aeróbio devidamente lavado com água deionizada, 600 mL de solução de antibiótico/glicose e 2 mL de solução de nutrientes (CaCl₂, FeCl₃.7H₂O, MgSO₄ e tampão fosfato) preparadas em conformidade com método de DBO (APHA, 2012). Promoveu-se aeração nos reatores utilizando aeradores de aquário e acertou-se o pH para 7.

Já para aclimação da biomassa anaeróbia foram montados reatores de 2 L utilizando 1000 mL de cada lodo anaeróbio devidamente lavado com água deionizada, 600 mL de solução de antibiótico/glicose e 200 mL de solução de nutrientes preparada a partir das soluções de macro e micronutrientes (Tabela 4.2). Para o preparo da solução de nutrientes utilizou-se 2 mL da solução de micronutrientes e 200 mL da solução de macronutrientes. Estas quantidades foram transferidas para balão de 1 L, que teve seu volume completado com água deionizada.

Tabela 4.2 – Composição das soluções de nutrientes para os reatores anaeróbios

Solução de Macronutrientes (L)		Solução de Micronutrientes (L)	
Reagentes	Quantidade (g)	Reagentes	Quantidade (g)
KH ₂ PO ₄	1,5	FeCl ₃ .H ₂ O	2,00
K ₂ HPO ₄	6,5	ZnCl ₂	0,05
NH ₄ Cl	5,0	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,03
Na ₂ S.9H ₂ O	0,5	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,50
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,05
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,05
		AlCl ₃	0,05
		CaCl ₂ .6H ₂ O	2,00
		H ₃ BO ₄	0,01
		HCl	1 mL

4.2.2.2 *Ensaio de biodegradabilidade aeróbia (Método de Zahn Wellens)*

Para avaliação da biodegradabilidade aeróbia foram montados reatores a partir de adaptação da metodologia proposta por Zahn-Wellens (OECD, 1995).

Foram monitorados reatores de 1,5 L contendo biomassa aclimatada ou não aclimatada na concentração de 0,5 g/L de sólidos voláteis. Em cada reator foram adicionados 1,5 mL de solução de nutrientes (CaCl₂, FeCl₃.7H₂O, MgSO₄ e tampão fosfato) preparadas em conformidade com método de DBO (APHA, 2012), lodo aeróbio aclimatado ou não aclimatado (lavados com água deionizada), solução contendo o antibiótico em estudo e glicose. Nos reatores denominados controle a única fonte de carbono disponível foi a glicose em concentração de 500 mg/L. Salienta-se que o experimento foi dividido em duas etapas, a

primeira delas com lodo não aclimatado e a segunda com lodo aclimatado. Promoveu-se aeração nos reatores utilizando aeradores de aquário.

4.2.2.3 Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia (Método FIELD)

Para avaliação da biodegradabilidade anaeróbia foram montados reatores a partir de uma adaptação da metodologia proposta por FIELD *et al.*, (1988). Salienta-se que, nesse caso, foram testados dois tipos de lodo, um proveniente do biodigestor anaeróbio e o outro proveniente do reator UASB.

Em cada reator montado foram adicionados 200 mL de solução de macronutrientes/micronutrientes (Tabela 4.2), lodo anaeróbio aclimatado ou não aclimatado, solução contendo o antibiótico em estudo e glicose. Da mesma forma que na biodegradabilidade aeróbia, nos reatores controle a glicose foi a única fonte de carbono. Nesse caso, como no anterior, o experimento foi dividido em duas etapas, a primeira delas com lodo não aclimatado e a segunda com lodo aclimatado a uma concentração de 0,5 mg/L de sólidos voláteis.

4.2.2.4 Medição e acompanhamento dos fármacos

Para monitoramento das análises alíquotas coletas foram filtradas em membranas hidrofílicas de 0,45 mm em PVDF (fluoreto de polivinilideno) e analisadas imediatamente após a coleta. Determinou-se a absorvidade molar em 273 nm, apenas no caso do norfloxacino, e a taxa de mineralização através da medida do carbono orgânico total para ambos os antibióticos.

4.2.3 Tratamento por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Os ensaios que avaliaram a degradação dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina através da oxidação por peróxido de hidrogênio foram realizados em béqueres de 2 litros, submetidos a agitação em Jar-Test em velocidade de 120 rpm.

As soluções analisadas, norfloxacino (15mg/L) e sulfato de gentamicina (100 mg/L), tiveram degradação testada nas seguintes proporções [C]:[OH]: 1:0.5, 1:1, 1:1.5 e 1:2. Avaliou-se, ainda, a eficiência da reação em pH 2, 3 e 7.

A eficiência do processo foi definida através da determinação da absorvidade molar em 273 nm, no caso do norfloxacino, e COT para ambos os fármacos. Nas análises de COT foi

necessário o acréscimo da enzima catalase, objetivando inibir a reação do peróxido residual. Para isto, as amostras (20 ml) tiveram seu pH acertado para 6,8 e foram acrescidas de 1 mL de solução contendo a enzima catalase (460 mg/L, em tampão fosfato – 0,04mol/L, pH 7; Sigma-Aldrich Lote 010M7010V), de acordo com a metodologia descrita por POOLE (2004). Sendo selecionada a condição de melhor remoção, a análise foi repetida e a amostra submetida a teste ecotoxicológico. Também para o teste de toxicidade, foi acrescida a catalase e, para garantir maior confiabilidade da análise, analisou-se também um branco contendo a mesma quantidade de enzima acrescida na solução ao final da reação.

4.2.4 Tratamento por radiação ultravioleta (UV)

4.2.4.1 Descrição do reator UV

As reações de fotodegradação foram realizadas em um reator cilíndrico de 50,5 x 320 mm e 280 mL de capacidade *PurePro Ultraviolet Water Sterilizer* (Figura 4.2), contendo um tubo de quartzo em seu interior. Ao tubo de quartzo foi conectada uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão de 6 W de potência, emitindo radiação máxima em 254 nm. A intensidade da lâmpada foi determinada por experimentos de actinometria, utilizando o método com ferrioxalato de potássio, de acordo com metodologia proposta por Murov (1973).

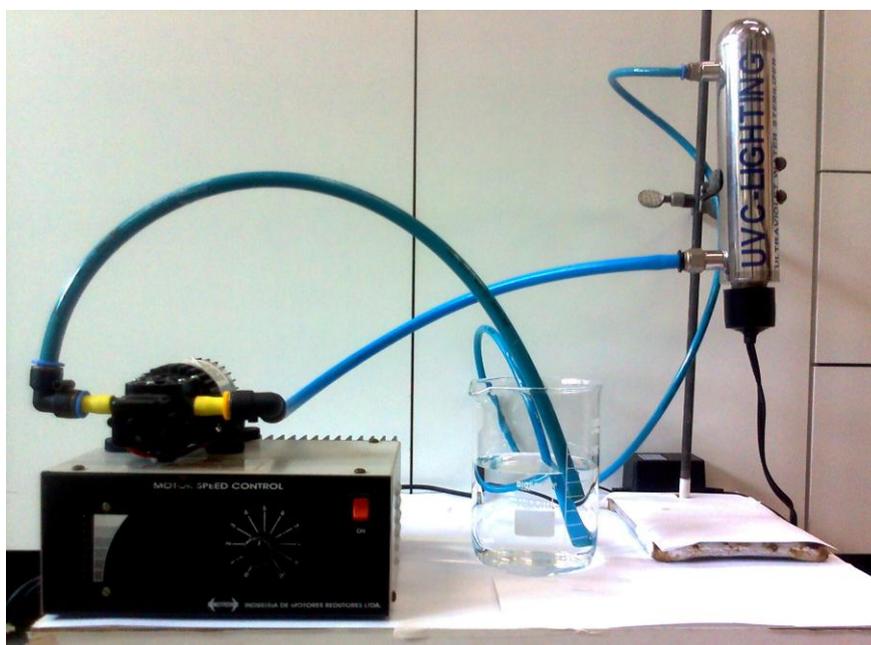


Figura 4.2 – Reator utilizado nos ensaios de fotodegradação

4.2.4.2 Descrição da metodologia de análise

Para realização dos ensaios com fotólise direta, 1L de solução contendo 15 mg/L de norfloxacino em pH 7 foi irradiada até estabilização da concentração do fármaco. A estabilização foi detectada através de leitura da absorvidade, em 273 nm, de amostras da solução ao longo do tempo. O procedimento para realização da fotólise direta com o sulfato de gentamicina foi o mesmo, com exceção do fato de que a concentração da solução foi de 100 mg/L do fármaco e a estabilização monitorada por leituras de COT. Os testes foram realizados em batelada a partir de um tanque de alimentação (Figura 4.2), com o auxílio de mangueiras e bomba peristáltica. A solução final de cada um dos fármacos foi submetida a teste ecotoxicológico.

Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (28°C), não sendo necessário resfriar o reator. A agitação das soluções foi mantida através da turbulência formada pela recirculação da solução.

4.2.5 Tratamento por radiação ultravioleta combinada com peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂)

No caso do norfloxacino, para realização dos ensaios utilizando UV/H₂O₂, foram avaliadas as relações [C]:[OH⁻] de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:6 em pH 7. Para a condição reacional de melhor remoção foram avaliados os pHs 2, 3, 5, 7 e 10. Já para o sulfato de gentamicina foram analisadas as relações [C]:[OH⁻] de 1:1, 1:2.5 e 1:3 em pH 7. De forma similar, para melhor condição reacional foram avaliados os pHs 3, 7 e 10.

Em todos os casos, após se acertar o pH das soluções e acrescentar o peróxido, as amostras foram transferidas para béqueres de 2L e conectadas ao reator UV (Figura 4.2), onde foram irradiadas até a estabilização da concentração do fármaco. A partir de então, foi selecionada a condição reacional de melhor remoção. Essa seleção foi realizada a partir de medições iniciais e finais da absorvidade em 273 nm (no caso do norfloxacino), para além da análise de COT, de forma a avaliar a quantidade remanescente dos fármacos contida na solução. Novamente, para as determinações por COT foi necessária a adição da enzima catalase, objetivando inibir a reação do peróxido residual. Ressalta-se que, durante todo o experimento, a temperatura foi monitorada e a agitação foi sustentada através de corrente formada pela utilização de bomba peristáltica.

Após a citada otimização dos ensaios, a melhor condição foi repetida para realização de análises ecotoxicológicas, para o qual também acrescentou-se a enzima catalase. Para garantir maior confiabilidade nos testes de toxicidade, foi analisado também um branco contendo a mesma quantidade de enzima acrescida na solução ao final da reação.

4.2.6 Tratamento por Fenton homogêneo

Para os ensaios envolvendo reações de Fenton, foram investigadas as melhores condições operacionais em termos de concentração de peróxido de hidrogênio e concentração de ferro ferroso. As demais variáveis foram mantidas constantes: concentração dos antibióticos, 120 rpm de velocidade de rotação e pH 3. O pH empregado foi o 3, visto que a literatura aponta amplamente como sendo o valor ideal para análises por Fenton.

Os experimentos foram realizados em triplicata segundo planejamento fatorial, que utilizou dois níveis de concentrações (alto e baixo) para cada um dos dois fatores investigados: concentração peróxido de hidrogênio e concentração de ferro ferroso. Para tal, foi utilizado o software estatístico Minitab[®] versão 15.

Além dos experimentos utilizando níveis alto e baixo de concentrações, foram adotados dois pontos centrais, totalizando quatorze experimentos por antibiótico estudado. O ponto central foi adicionado ao planejamento fatorial para aumentar os graus de liberdade e para verificar estatisticamente a curvatura da resposta. Nas Tabelas 4.3 e 4.4 são apresentadas as matrizes do planejamento fatorial utilizadas para os antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina, respectivamente.

Tabela 4.3 – Matriz do planejamento fatorial para os experimentos de Fenton homogêneo para o antibiótico norfloxacino

Experimentos	Ponto Central	$[\text{OH}^-][\text{Fe}^{2+}]$
1	0	[4][2]
2	1	[2][1]
3	1	[2][1]
4	1	[8][4]
5	1	[8][4]
6	1	[8][4]
7	1	[8][1]
8	1	[2][4]
9	1	[2][1]
10	1	[2][4]
11	1	[8][1]
12	0	[4][2]
13	1	[2][4]
14	1	[8][1]

Tabela 4.4 – Matriz do planejamento fatorial para os experimentos de Fenton homogêneo para o antibiótico sulfato de gentamicina

Experimentos	Ponto Central	$[\text{OH}^-][\text{Fe}^{2+}]$
1	0	[2.5][2.5]
2	1	[1][1]
3	1	[1][1]
4	1	[4][4]
5	1	[4][4]
6	1	[4][4]
7	1	[4][1]
8	1	[1][4]
9	1	[1][1]
10	1	[1][4]
11	1	[4][1]
12	0	[2.5][2.5]
13	1	[1][4]
14	1	[4][1]

Para realização dos ensaios, 1L de cada solução foi transferida para béquer, onde o pH foi modificado para 3. As soluções foram colocadas para agitar em Jar Test a uma velocidade de 120 rpm e foram acrescentadas as quantidades de Fe^{2+} e peróxido hidrogênio, de acordo com o planejamento fatorial.

Para monitoramento da degradação dos compostos, foram recolhidas alíquotas para determinação da absorvibilidade em 273 nm (no caso do norfloxacino) e COT por um período de 60 minutos. As alíquotas tiveram sua absorvibilidade determinada imediatamente após a coleta e, para as determinações por COT, foi necessária o acréscimo da enzima catalase, objetivando inibir a reação do peróxido residual.

Após a seleção da melhor condição de remoção através do planejamento fatorial, a melhor condição foi repetida e monitorou-se: absorvibilidade (no caso do norfloxacino), COT e toxicidade, para os quais também foi necessário o acréscimo de enzima catalase. Para garantir maior confiabilidade nos testes ecotoxicológicos, foi analisado também um branco contendo a mesma quantidade de enzima acrescida na solução ao final da reação.

4.2.7 Tratamento por foto-Fenton homogêneo

Para realização dos ensaios de foto-Fenton foram repetidas as condições que, no experimento com Fenton homogêneo, apresentaram maior eficiência de remoção para cada um dos fármacos. A diferença, nesse caso, é que as soluções foram irradiadas por UV durante toda a duração do teste. Os testes foram realizados em batelada a partir de um tanque de alimentação (Figura 4.2), com o auxílio de mangueiras e bomba peristáltica. A solução final de cada um dos fármacos foi submetida a teste ecotoxicológico. Da mesma maneira que nas demais situações, para garantir maior confiabilidade nos testes ecotoxicológicos, foi analisado também um branco contendo a mesma quantidade de enzima acrescida na solução ao final da reação.

Para fins de monitoramento foram recolhidas alíquotas para análise em termos de UV/Vis (no caso do norfloxacino) e COT. Novamente, para as determinações por COT foi necessária o acréscimo da enzima catalase, objetivando inibir a reação do peróxido residual.

4.3 Análise estatística

Para análise estatística desse trabalho foi utilizado o software estatístico STATISTICA® 8.0.

Buscando verificar se existe uma correlação positiva entre os resultados de toxicidade e a porcentagem de remoção dos fármacos durante os processos de tratamento procedeu-se, inicialmente, com o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Uma vez que os dados não apresentaram normalidade, realizou-se o teste de *Spearman* com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes ecotoxicológicos com as amostras brutas

As análises ecotoxicológicas realizadas com os efluentes brutos mostraram que o norfloxacino a 15 mg/L é tóxico, com o CE_{50} de 26,25% em 30 minutos, valor que significa uma concentração de 3,9 mg/L (Figura 5.1). Estudos anteriores (BACKHAUS *et al.*, 2000), realizados em intervalo de tempo diferente, apontam a toxicidade do fármaco para o mesmo organismo, *Aliivibrio fischeri*, como igual a 22 $\mu\text{g/L}$ em teste com tempo de exposição de 24 horas. De fato, é esperado um CE_{50} inferior em análises mais longas. Estudos com as algas *P.subcapitata* e *Chrorella vulgaris* apontam CE_{50} do norfloxacino como igual a 16,6 mg/L e 10,4 mg/L (EGUCHI *et al.*, 2004).

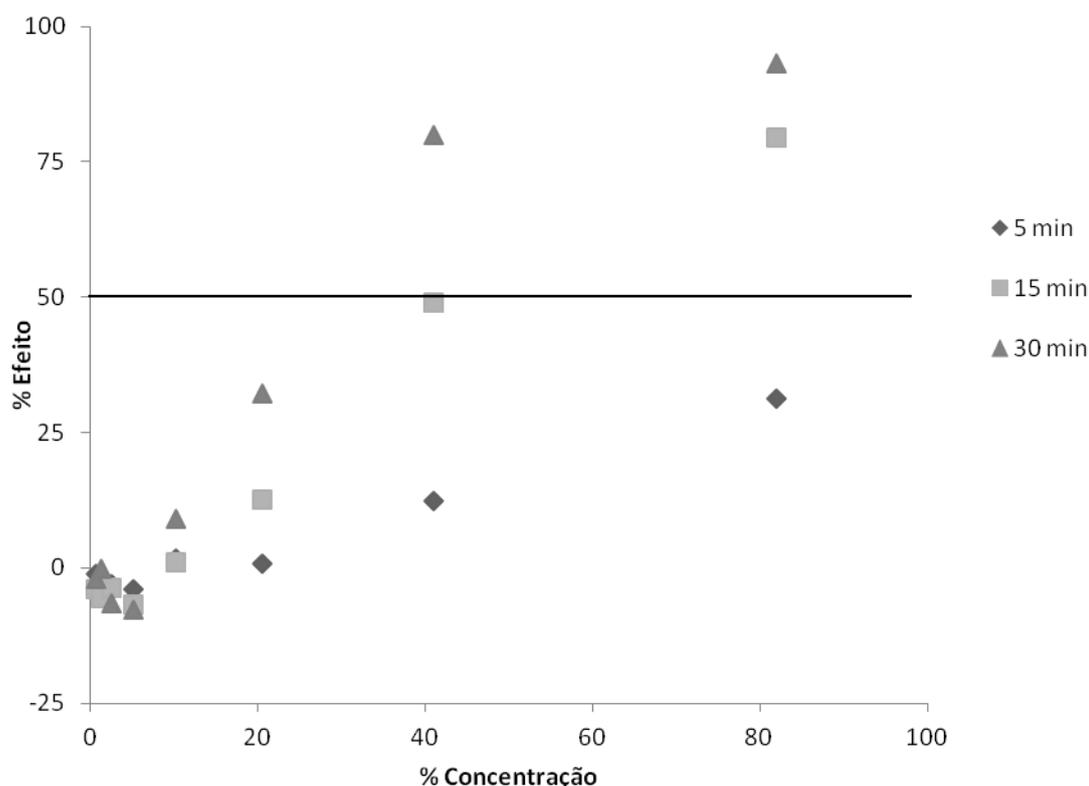


Figura 5.1 – Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de norfloxacino nos tempos 5, 15 e 30 minutos

Já o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não apresenta toxicidade no teste em 30 minutos (Figura 5.2). No caso desse fármaco foi detectada *hormesis*, isso é, um desvio positivo apresentado pelo organismo-teste na presença do contaminante. Ressalta-se que a detecção da *hormesis* não é sinal de que o contaminante seja benéfico ao organismo, ao contrário, pode-se estar diante de contaminante que se apresenta tóxico em testes de toxicidade crônica ou testes

de toxicidade aguda em maior concentração (CALABRESE, 2008). Ainda segundo CALABRESE (2008), a *hormesis* é considerada um mecanismo de evolução, pois gera uma resposta adaptativa dos organismos de forma a evitar a extinção da espécie.

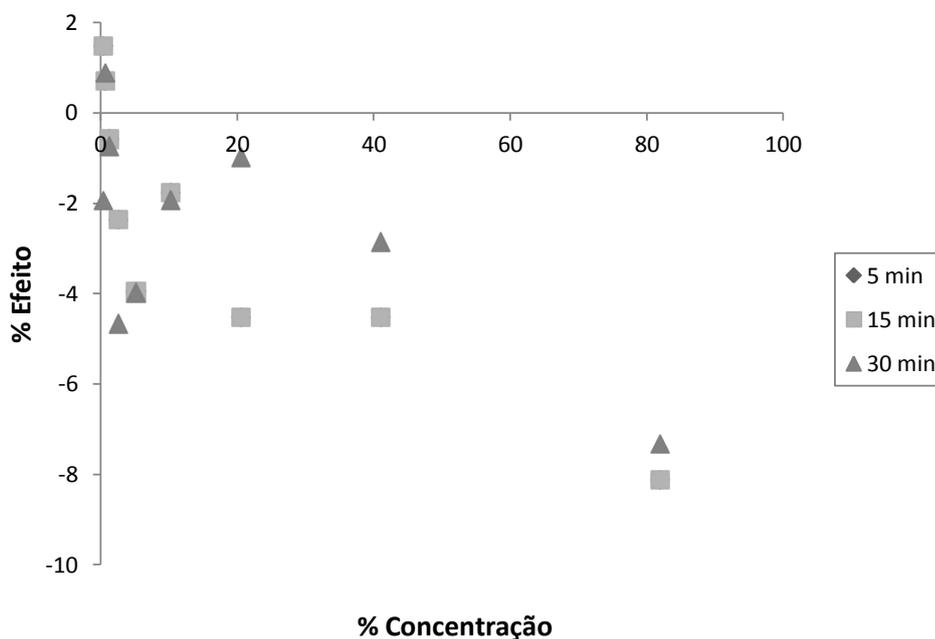


Figura 5.2 – Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de norfloxacino nos tempos 5, 15 e 30 minutos

5.2 Tratamento Biológico

5.2.1 Biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos fármacos

Conforme detalhado na descrição da metodologia dessa pesquisa, para avaliação da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia foram monitorados reatores contendo os fármacos em estudo (Figura 5.3).



Figura 5.3 – Monitoramento da biodegradabilidade aeróbia (a) e anaeróbia (b) dos antibióticos norfloxacino e sulfato de gentamicina

A seguir, são apresentados os resultados obtidos durante o processo de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do antibiótico norfloxacino, com e sem aclimação da biomassa. Nas figuras 5.4 e 5.5 esses resultados são expressos em função do COT, já nas figuras 5.6 e 5.7 esses resultados apresentam-se de forma mais específica, isso é, em termos de UV/VIS.

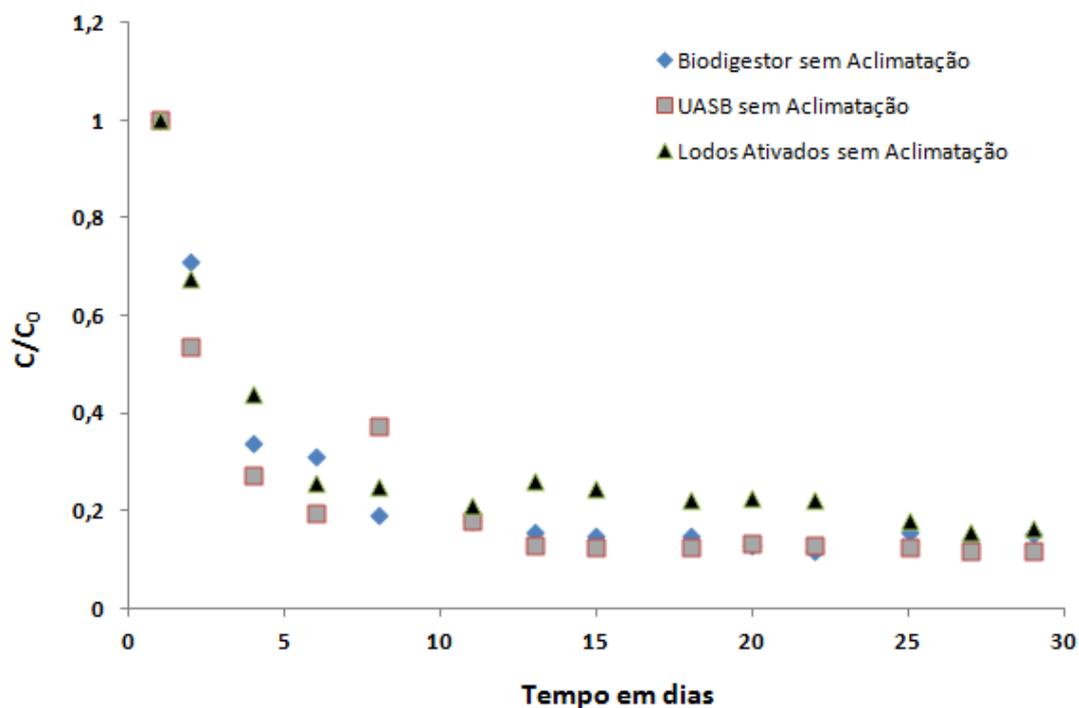


Figura 5.4 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacino sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: Lodos Ativados - $C_{inicial}= 90,36\text{mg/L}$ e $C_{final}=14,8\text{mg/L}$; Biodigestor - $C_{inicial}= 99,8\text{mg/L}$ e $C_{final}= 15,2\text{mg/L}$; UASB - $C_{inicial}= 128,2\text{mg/L}$ e $C_{final}= 15\text{mg/L}$

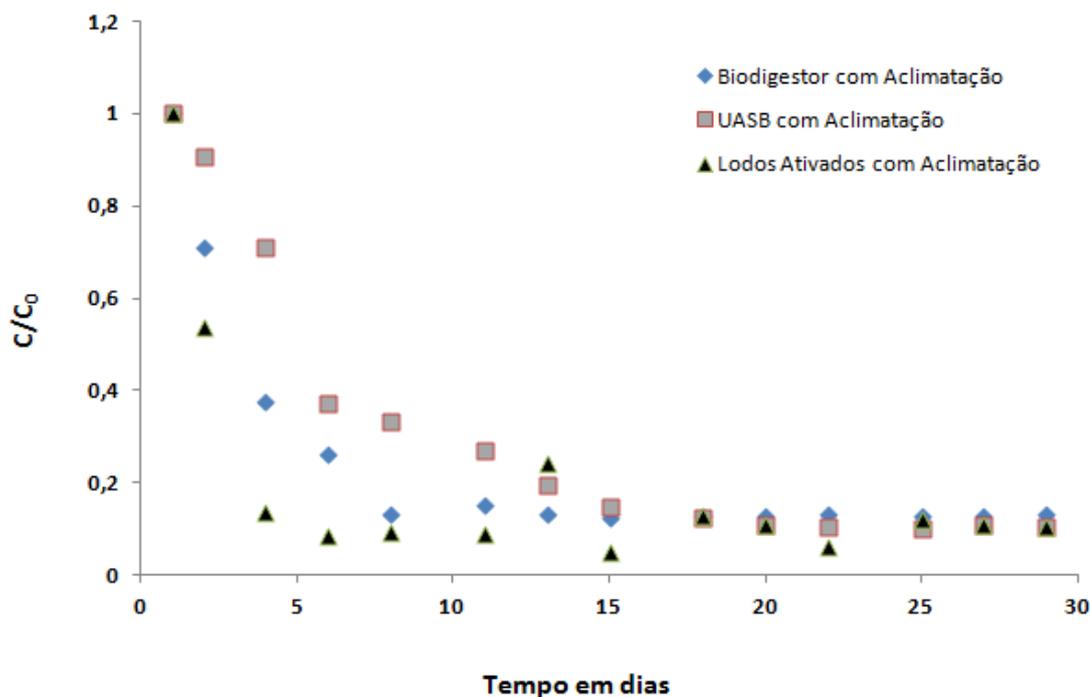


Figura 5.5 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacin com aclimação da biomassa. Condições experimentais: Lodos Ativados → $C_{inicial}= 104,5\text{mg/L}$ e $C_{final}=11\text{mg/L}$; Biodigestor → $C_{inicial}= 133,6\text{mg/L}$ e $C_{final}= 17,6\text{mg/L}$; UASB → $C_{inicial}= 175,3\text{mg/L}$ e $C_{final}= 18,6\text{mg/L}$

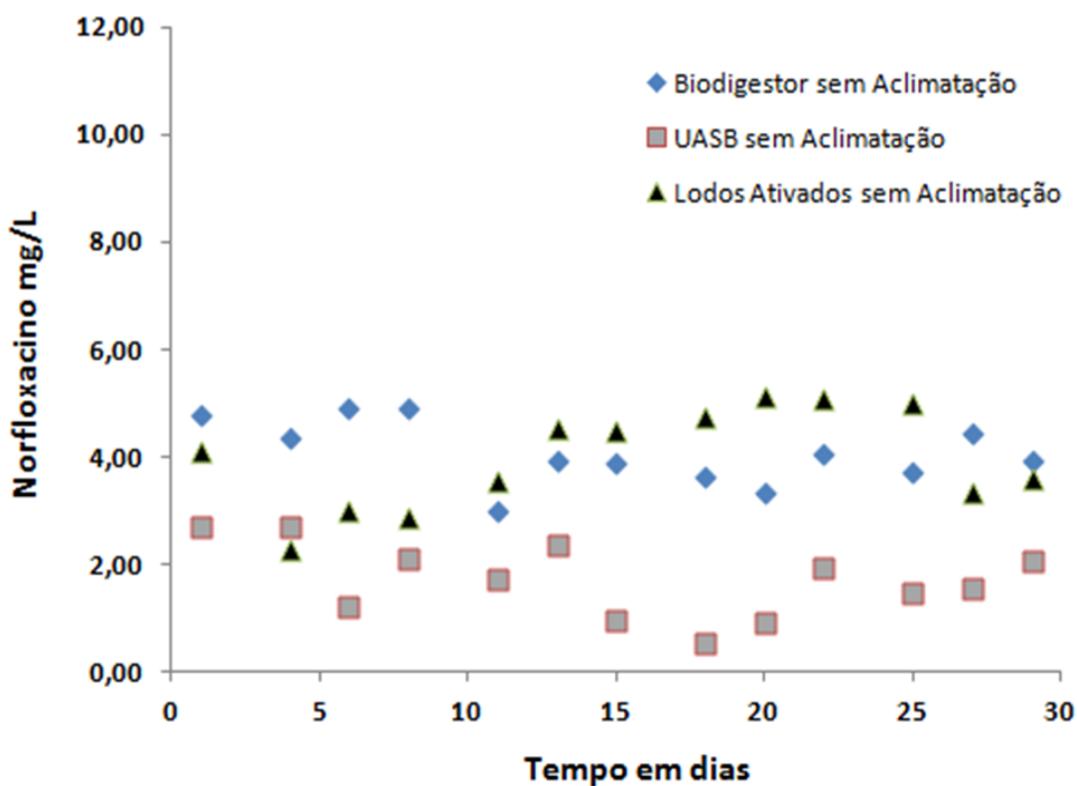


Figura 5.6 – Monitoramento por UV/VIS da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacin sem aclimação da biomassa

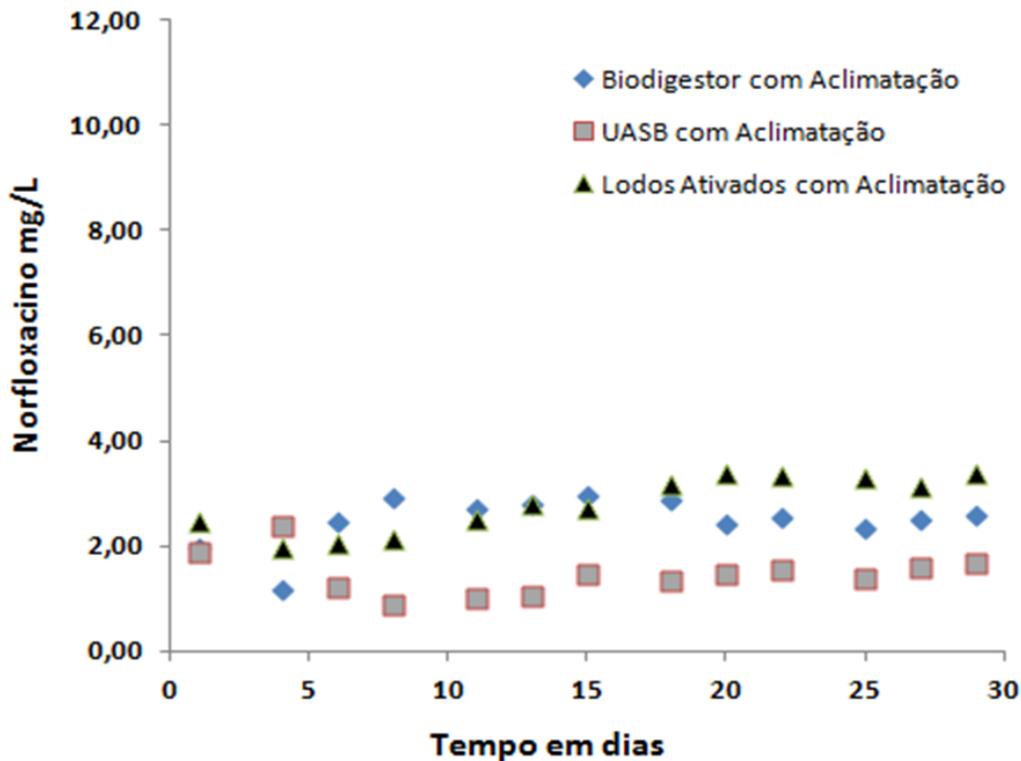


Figura 5.7 – Monitoramento por UV/VIS da biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia do norfloxacino com aclimação da biomassa

Observa-se que a eficiência de remoção permanece em aproximadamente 85% de COT, mas quando se avalia a remoção do composto alvo de maneira específica (UV/VIS), verifica-se uma redução máxima de 20%. Isso significa dizer que a redução significativa de matéria orgânica está relacionada à presença de glicose, que é facilmente biodegradada, não à degradação do antibiótico. De fato, uma série de estudos têm demonstrado que a maioria dos antibióticos não são biodegradáveis (ALEXY *et al*, 2004; GARTISER *et al*, 2007; LI *et al*, 2008).

Os resultados encontrados corroboram, ainda, com os estudos realizados por CRUZ e colaboradores (2012) em que norfloxacino foi encontrado após tratamento biológico com lodos ativados, em uma estação de tratamento de esgoto na Suíça. Essas análises demonstram a característica refratária deste membro da família das fluorquinolonas.

As análises laboratoriais evidenciaram, ainda, um pequeno aumento na concentração de norfloxacino nos reatores em que utilizou-se a biomassa aclimatada em comparação com aqueles em que a biomassa não foi aclimatada (Figura 5.6 e 5.7). Estes resultados indicam que, em períodos com pouca disponibilidade de matéria orgânica, ocorre lise celular e parte

do norfloxacino adsorvido anteriormente passa a ser liberado para o meio reacional. Os resultados são confirmados através do monitoramento dos reatores brancos, onde a presença de norfloxacino é exclusivamente advinda da adsorção prévia do antibiótico pelas bactérias no processo de aclimação e liberado por lise celular.

Com relação à aclimação, Fernicola e Oliveira (2002) demonstraram que uma mistura complexa de microrganismos pode se adaptar à presença de determinados xenobióticos e aumentar a eficiência do processo de degradação. Contudo, neste trabalho, observou-se um aumento muito discreto na eficiência da remoção do antibiótico norfloxacino após aclimação da biomassa (Figura 5.8).

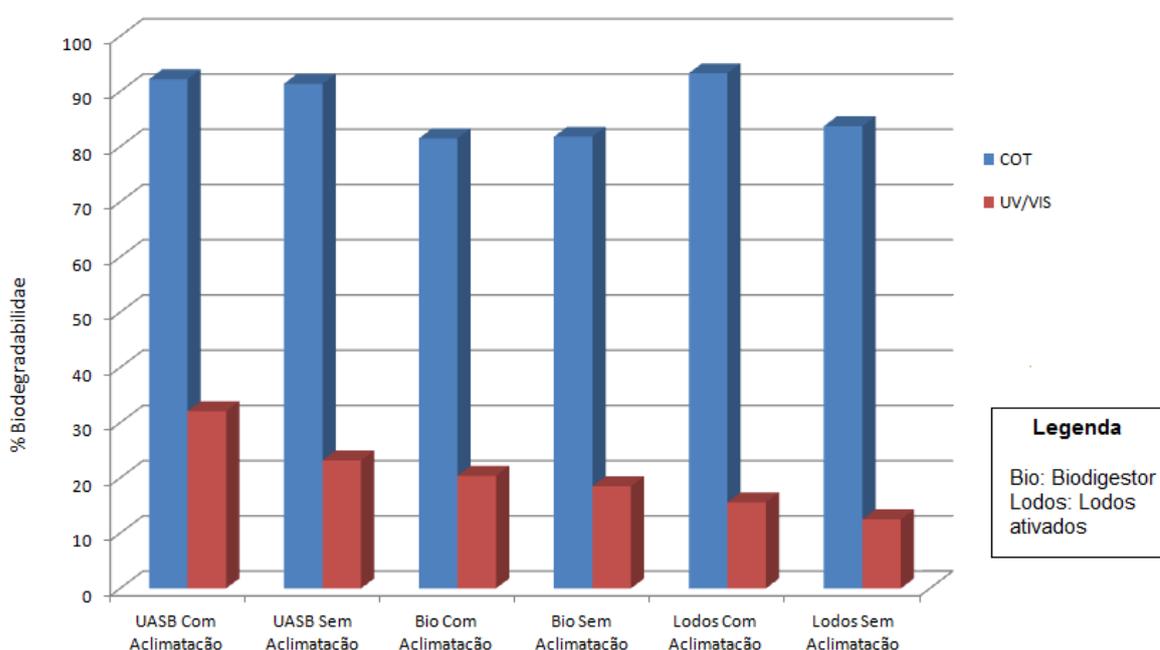


Figura 5.8 – Eficiência da biodegradabilidade do Norfloxacino, em termos de COT e UV/VIS, utilizando biomassa aclimatada e sem aclimação

Com relação aos reatores contendo sulfato de gentamicina, observa-se padrão semelhante ao observado com o norfloxacino (Figuras 5.9, 5.10 e 5.11). Isso é, elevada remoção de matéria orgânica em termos de COT. Contudo, não se pode afirmar que a taxa de remoção do antibiótico foi também elevada, uma vez que não é possível monitorar o fármaco de maneira específica. Espera-se que, de forma semelhante ao ocorrido com o norfloxacino, o sulfato de gentamicina seja também um composto refratário. Gartiser e colaboradores (2007) realizaram estudo que comprovou a natureza recalcitrante desse aminoglicosídeo, a partir da detecção da impossibilidade de degradação desse fármaco quando submetido a tratamento biológico.

Com relação às eficiências de remoção do carbono orgânico total, com o lodo proveniente de Lodos Ativados alcançou-se remoção de 60% com biomassa não aclimatada e 81% utilizando-se biomassa aclimatada; com o lodo do Biodigestor Anaeróbio removeu-se 83% e 88%, com uso de lodo não aclimatado e aclimatado, respectivamente. Já no tratamento com o uso do lodo UASB, a remoção com uso de biomassa não aclimatada foi de 88% e, com uso de biomassa aclimatada, de 90%

A dificuldade de monitoramento específico do sulfato de gentamicina também impossibilitou o acompanhamento de um possível fenômeno de lise celular, ocorrido com o norfloxacino e já citado acima.

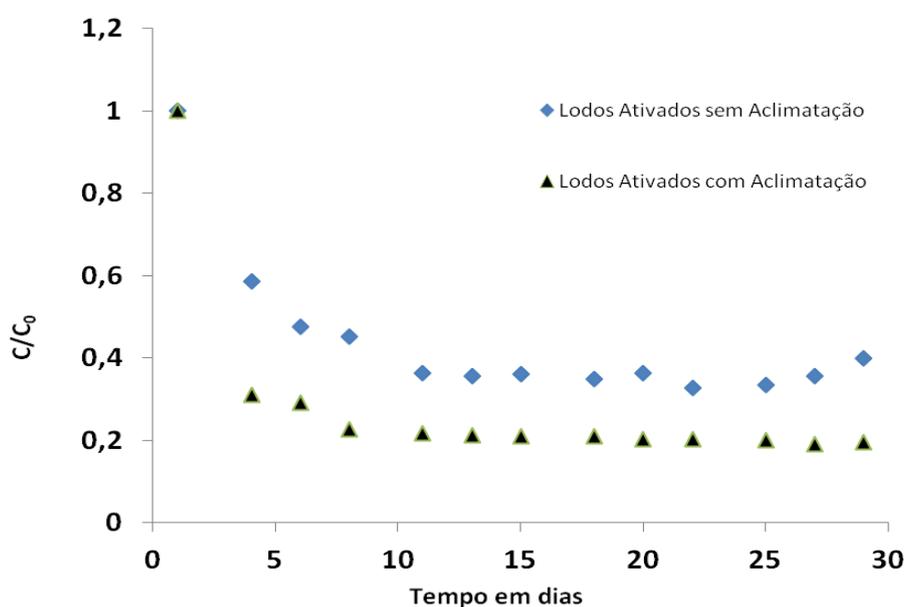


Figura 5.9 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade aeróbia do sulfato de gentamicina com e sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: Lodos Ativados sem aclimação → $C_{inicial}= 60,8\text{mg/L}$ e $C_{final}= 24,2\text{mg/L}$; Lodos Ativados com aclimação → $C_{inicial}= 186,5\text{mg/L}$ e $C_{final}= 36,1\text{mg/L}$

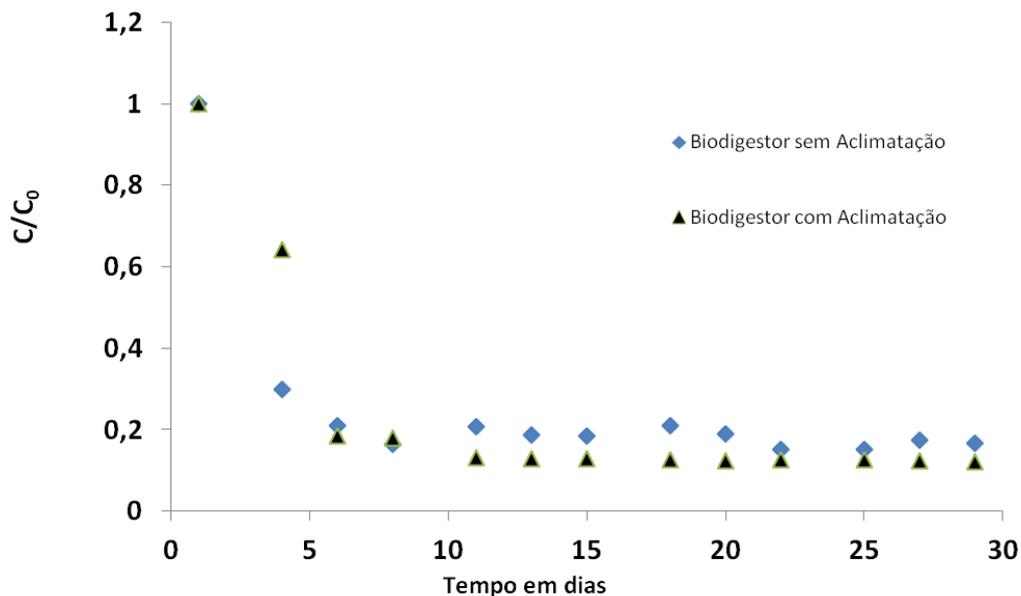
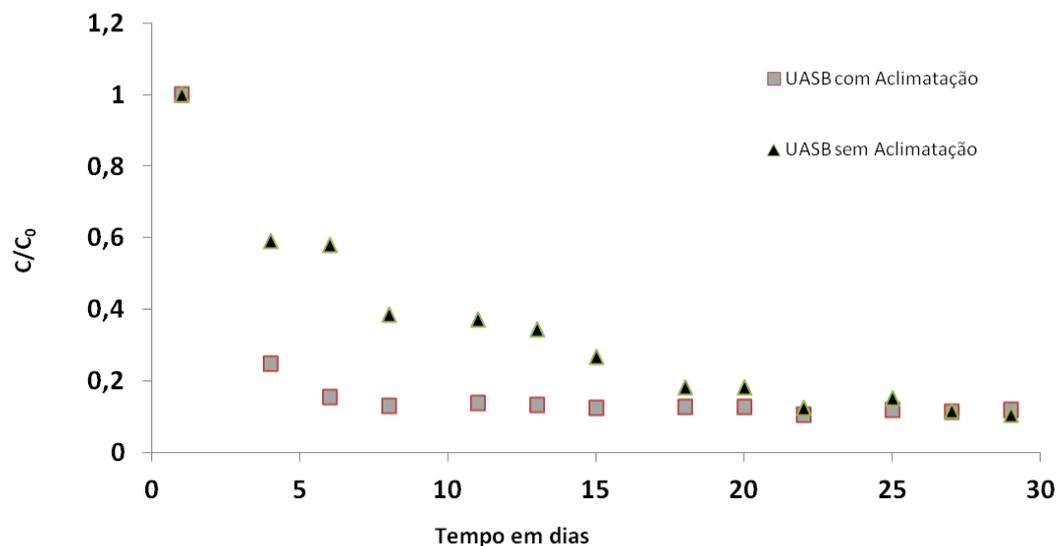


Figura 5.10 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade anaeróbia (biodigestor anaeróbio) do sulfato de gentamicina com e sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: Biodigestor sem aclimação → $C_{inicial} = 114,8\text{mg/L}$ e $C_{final} = 19,2\text{mg/L}$. Biodigestor com aclimação → $C_{inicial} = 179,7\text{mg/L}$ e $C_{final} = 21,8\text{mg/L}$



5.11 – Monitoramento por COT da biodegradabilidade anaeróbia (UASB) do sulfato de gentamicina com e sem aclimação da biomassa. Condições experimentais: UASB sem aclimação → $C_{inicial} = 68,1\text{mg/L}$ e $C_{final} = 7,1\text{mg/L}$; UASB com aclimação → $C_{inicial} = 135,8\text{mg/L}$ e $C_{final} = 9\text{mg/L}$

Em termos de eficiência de degradação, o lodo do reator UASB mostra-se mais eficiente que aquele do Biodigestor Anaeróbio, que é ainda mais eficiente que a biomassa dos Lodos Ativados, tanto para o norfloxacino quanto para o sulfato de gentamicina. Uma hipótese para a baixa eficiência do processo usando biomassa de Lodos Ativados é o fato de o norfloxacino e o sulfato de gentamicina serem antibióticos com largo espectro de ação contra organismos

aeróbios, sugerindo que a presença desses fármacos cause maior efeito deletério nas bactérias presentes na biomassa advinda do tratamento aeróbio.

5.2.2 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento biológico

Nos testes de biodegradabilidade realizados com biomassa provenientes dos reatores com biomassa UASB, tanto com bactérias aclimatadas quanto com bactérias não aclimatadas, não foi detectada toxicidade aguda das amostras. Em todos os testes, incluindo o proveniente do branco (glicose), foi detectada a *hormesis*. Esse resultado, provavelmente, justifica-se pelo fato de ser esse o processo de tratamento mais eficiente para a remoção dos antibióticos estudados.

Já nos testes realizados com biomassa provenientes dos biodigestores anaeróbios, houve indício de toxicidade em alguns dos reatores. Isto é, o meio reacional não estava tóxico ($CE_{50} > 81,9\%$), mas houve efeito de inibição de luz sob as bactérias. Nesse caso, os resultados são expressos em “maior porcentagem de efeito”, o que significa maior efeito de inibição de luz detectada. No reator com norfloxacino e biomassa sem aclimação, o maior efeito de inibição de luz observado foi de 12,99% em 30 minutos. Já no reator com norfloxacino, onde foi realizado o processo de aclimação da biomassa, esse efeito foi de 7,88% em 30 minutos, portanto menor que o observado na presença de bactérias não aclimatadas, que são menos eficientes. Para os demais reatores, detectou-se *hormesis*.

É importante esclarecer que amostras cujo resultado de toxicidade é expresso em “maior porcentagem de efeito” geralmente são tóxicas em testes de toxicidade aguda mais longos ou, ainda, em testes de toxicidade crônica. Conforme já mencionado, uma série de estudos indica que o fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para esses organismos.

Os resultados encontrados nos reatores com biomassa advinda de tratamento com lodos ativados foram os mais tóxicos dentre os avaliados, evento que se justifica pela menor eficiência desse método em comparação aos demais. Os resultados de toxicidade dos efluentes supracitados (Tabela 5.1) elucidam que os derivados dos reatores com biomassa aclimatada apresentam toxicidade mais elevada que aqueles com biomassa não aclimatada. Esse fato parece contradizer os resultados obtidos pela avaliação do tratamento biológico, que apontam

a aclimação como responsável por discreta melhoria na capacidade de biodegradabilidade das bactérias. Entretanto, pode-se supor que essa situação deve-se a formação de metabólitos tóxicos: provavelmente as bactérias aclimatadas estão, em verdade, degradando mais eficientemente os fármacos, porém gerando metabólitos mais tóxicos em função dessa decomposição. Além disso, a aclimação intensifica o já citado processo de lise celular, o que aumenta a quantidade de fármaco no meio reacional e, por consequência, a toxicidade.

Tabela 5.1 – Resultados de toxicidade (CE₅₀) de efluentes provenientes de tratamento por Lodos Ativados (aclimatados e não aclimatados)

Tratamento por Lodos Ativados		
Reator		CE ₅₀ (30 min)
Não aclimatados	Controle	58,83%
	Norfloxacino	25,94%
	Gentamicina	32%
Acimatados	Controle (Iodo Norfloxacino)	1,31%
	Norfloxacino	2,14%
	Controle (Iodo Gentamicina)	8,55%
	Gentamicina	3,58%

É importante salientar que mesmo o efluente proveniente do reator controle (glicose) de Lodos Ativados é tóxico (CE₅₀ (30 min) 58,83%), embora menos que os demais. Isso sugere que a biomassa libera substâncias anteriormente adsorvidas, que proporcionam toxicidade ao efluente. No caso da elevada toxicidade encontrada nos reatores controle após aclimação, pode-se explicar em função do fenômeno de lise celular, já mencionado acima.

Observa-se que os efluentes contaminados com norfloxacino e tratados por Lodos Ativados são ainda mais tóxicos que os contaminados com o sulfato de gentamicina nas mesmas circunstâncias. Resultado semelhante foi observado através da medição de toxicidade dos efluentes brutos, onde o norfloxacino apresentou toxicidade e o sulfato de gentamicina proporcionou *hormesis*. Assim sendo, a toxicidade mais elevada dos efluentes contaminados com gentamicina em comparação ao controle (glicose), sugere a formação de metabólitos tóxicos no processo de degradação do antibiótico. Outra hipótese seria uma relação sinérgica, em termos de toxicidade, entre a biomassa de Lodos Ativados e o sulfato de gentamicina.

Como mencionado, os efluentes mais tóxicos dentre todos os testados são os provenientes de reatores de Lodos Ativados e contaminados com norfloxacino – mesmo que essa contaminação tenha ocorrido apenas durante o processo de aclimação (Figura 5.12).

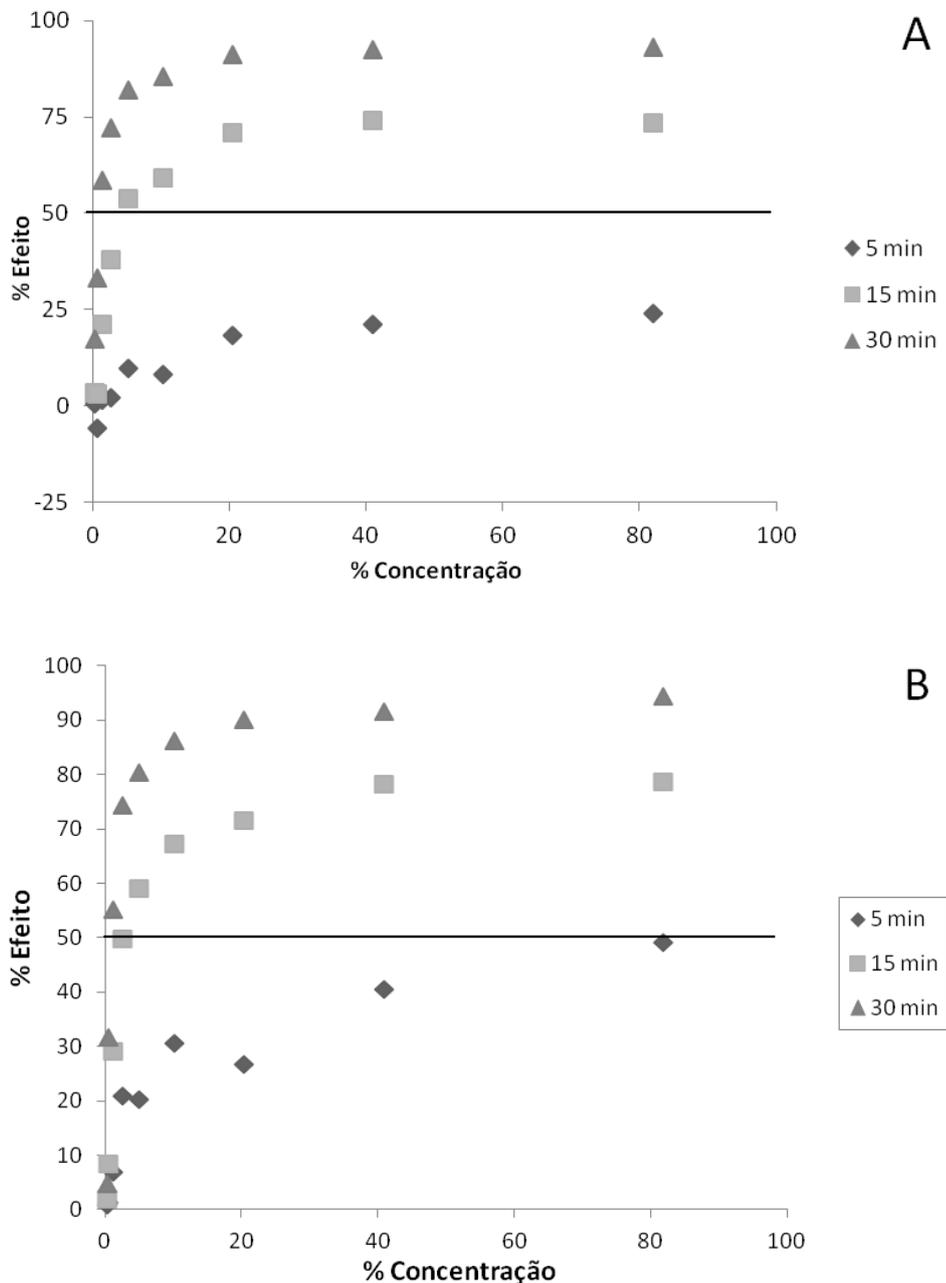


Figura 5.12 – (A) % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em reator controle de Lodos Ativados com biomassa aclimatada com norfloxacino (B) % de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em reator de Lodos Ativados contaminado com norfloxacino e utilizando biomassa aclimatada

5.3 Tratamento por peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

5.3.1 Degradação por H_2O_2 do norfloxacino e sulfato de gentamicina

Conforme detalhado na descrição da metodologia dessa pesquisa, buscou-se as condições reacionais ótimas a partir de testes de eficiência de degradação em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e utilizando-se o pH 2, 3 e 7.

Para o norfloxacino, a melhor eficiência de remoção acontece após sessenta minutos de reação, em pH 3 e empregando-se a relação $[C]:[OH^-]$ de 1:0,5 (Figura 5.13). Observa-se uma degradação de apenas 2% do antibiótico, que pode estar relacionada à sensibilidade do método analítico. Os resultados sugerem, ainda, que o aumento na concentração peróxido de hidrogênio não interfere na eficiência de remoção deste antibiótico. Essa eficiência foi monitorada a partir de leitura por UV/VIS, que permite o acompanhamento do fármaco de forma mais específica.

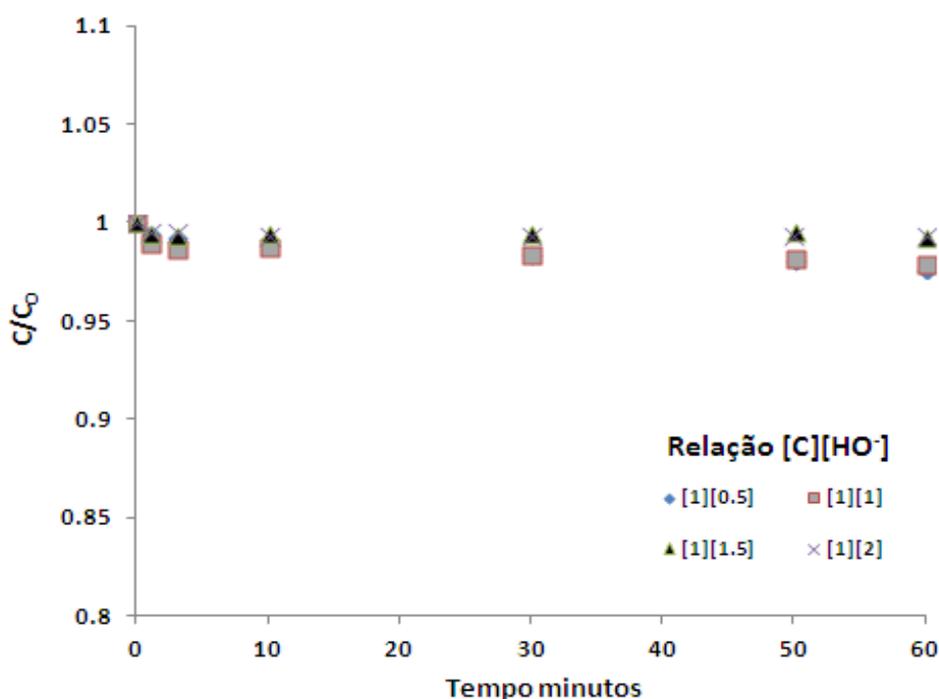


Figura 5.13 – Monitoramento da degradabilidade do antibiótico norfloxacino utilizando H_2O_2 e leitura por UV/VIS em 273 nm. Condições experimentais: Norfloxacino_{inicial} = 15mg/L; [1]:[0,5] → Norfloxacino_{final} = 14,5mg/L; [1]:[1] → Norfloxacino_{final} = 14,7mg/L; [1]:[1,5] → Norfloxacino_{final} = 14,8mg/L; [1]:[2] → Norfloxacino_{final} = 14,9mg/L; temperatura = 28°C; pH 3

Já para o sulfato de gentamicina, a melhor eficiência de remoção acontece após sessenta minutos de reação, em pH 3 e empregando-se a relação $[C]:[OH^-]$ de 1:1,5 (Figura 5.14). Nesse caso, o acompanhamento da degradação do fármaco foi realizado através de leitura de

COT, em função da ausência de grupos cromóforos nesse antibiótico. Dessa forma, não foi possível verificar a degradação do fármaco de forma específica, mas observou-se uma eficiência menor que 2%, que também pode estar relacionada a sensibilidade do método analítico.

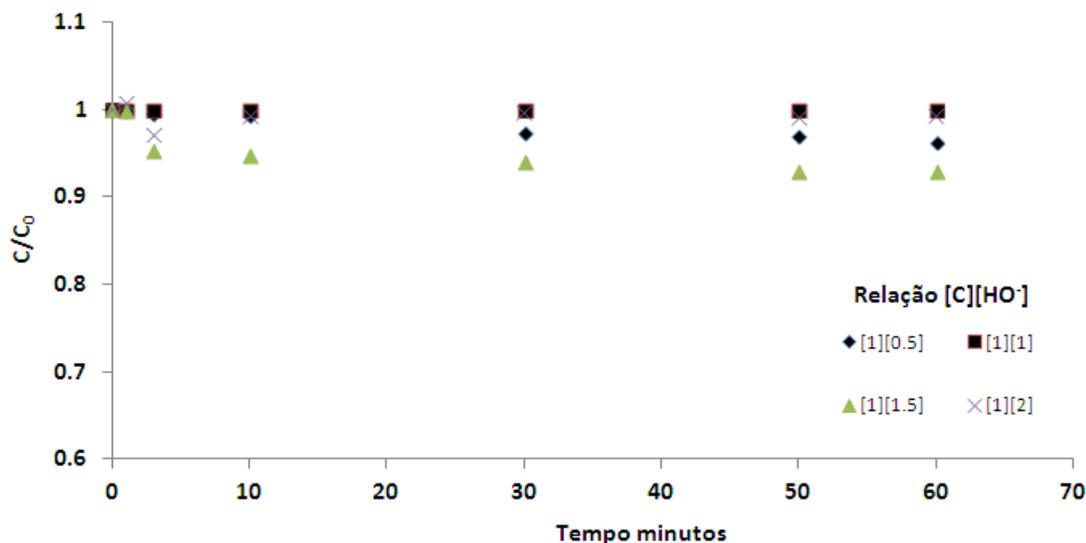


Figura 5.14 – Monitoramento da degradabilidade do antibiótico sulfato de gentamicina utilizando H_2O_2 e leitura por COT. Condições experimentais: [Sulfato de gentamicina]= 100 mg/L; $C_{inicial}$ = 17,8mg/L; [1]:[0,5] $\rightarrow C_{final}$ = 17,2mg/L; [1]:[1] $\rightarrow C_{final}$ = 17,8mg/L; [1]:[1,5] $\rightarrow C_{final}$ = 16,6mg/L; [1]:[2] $\rightarrow C_{final}$ = 17,7mg/L; temperatura = 28°C; pH 3

5.3.2 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por H_2O_2

As análises ecotoxicológicas realizadas com as amostras após término do experimento esclarecem que não há toxicidade remanescente. No caso do norfloxacino a amostra foi considerada não tóxica, apresentando maior inibição de luz observada de 27,82% no teste em 30 minutos. Já no caso do sulfato de gentamicina, encontrou-se *hormesis*, portanto o mesmo resultado da amostra bruta a 100 mg/L. Isso significa que o tratamento por H_2O_2 é eficiente na eliminação da toxicidade da amostra, no caso do norfloxacino, e que cumpre o objetivo de não geração de subprodutos tóxicos de degradação, muito comumente descritos na literatura durante processos oxidativos de tratamento (Li *et al*, 2008). Vale mencionar que o H_2O_2 , é tóxico por si só (REICHWALDT *et al*, 2012), porém, ao reagir com a solução, não só deixa de ser tóxico como é capaz de degradar parte dos fármacos e gerar uma amostra final não tóxica.

A utilização de peróxido de hidrogênio individualmente para degradar fármacos não é muito apresentada na literatura, isso devido à elevada estabilidade destes compostos, o que dificulta

sua efetiva remoção. Esse resultado foi comprovado pelas já apresentadas análises de degradação dos fármacos. Apesar disso, conforme demonstrado pelas análises de toxicidade acima descritas, trata-se de tratamento capaz de extinguir a toxicidade ou manter a atoxicidade das amostras analisadas.

5.4 Tratamento por radiação ultravioleta (UV)

5.4.1 Actinometria

O cálculo da intensidade luminosa da lâmpada integrante do reator UV ao longo do tempo foi realizado conforme detalhado na descrição da metodologia desse trabalho, gerando-se os dados descritos na Figura 5.15. O valor médio desses dados aponta para uma intensidade luminosa de $4,94 \times 10^{-5}$ Einstein/min.

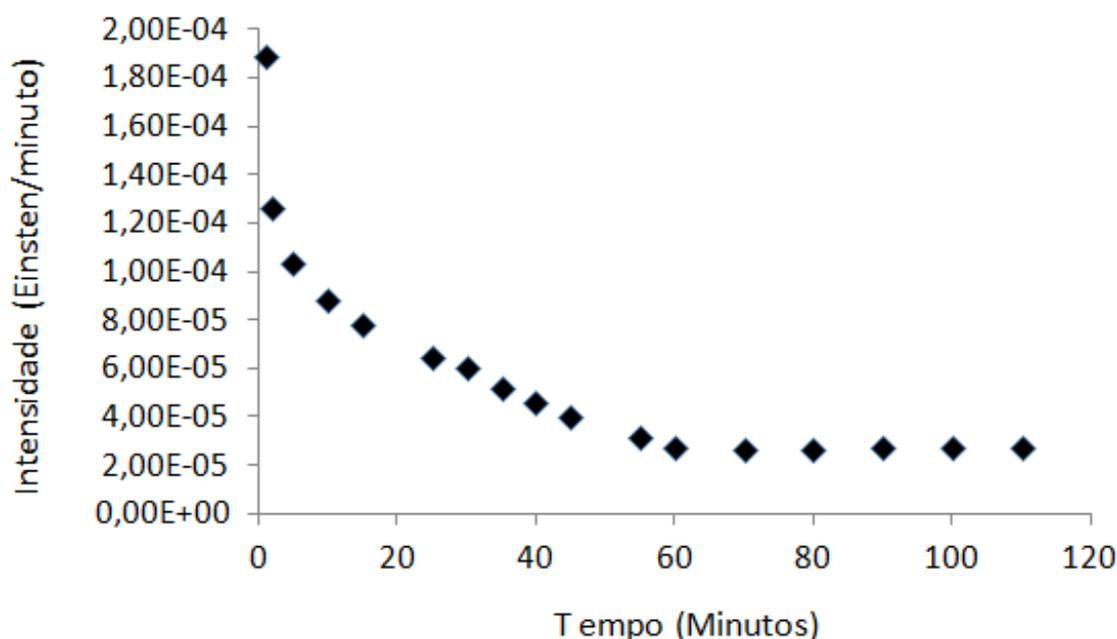


Figura 5.15 – Intensidade luminosa da lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão de 6W de potência em função do tempo

5.4.2 Degradação por fotólise do norfloxacino e sulfato de gentamicina

A degradação do antibiótico norfloxacino via fotólise direta foi investigada em pH 7 utilizando-se concentração inicial de 15 mg/L. Os resultados da irradiação UV ao longo do tempo são apresentados na Figura 5.16.

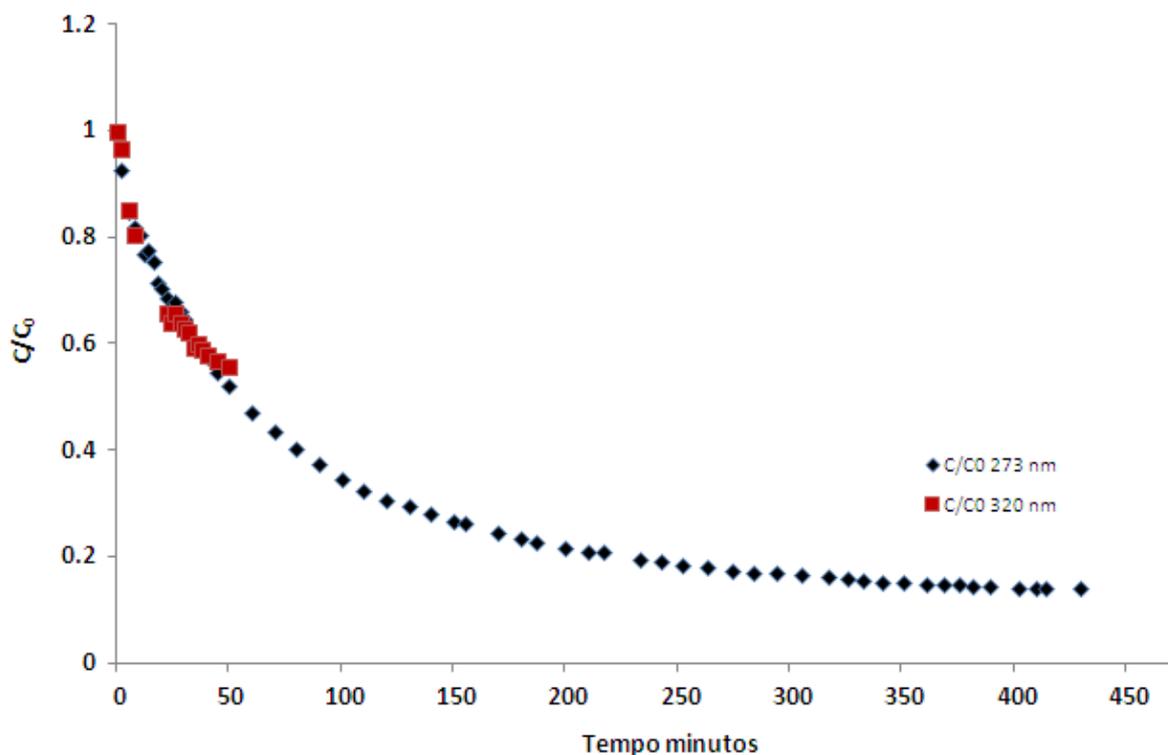


Figura 5.16 – Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: Norfloxacino_{inicial} = 15 mg/L; 320nm → Norfloxacino_{final} = 7,5 mg/L; 273nm → Norfloxacino_{final} = 2,25 mg/L; Intensidade da luz = $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura = 27°C; pH=7; λ =273 nm e 320 nm

Primeiramente, ressalta-se o desaparecimento da banda de absorção em 320 nm durante a fotólise do norfloxacino. Trata-se, portanto, de uma banda de absorção pouco sensível. Observa-se uma remoção de, aproximadamente, 85% do antibiótico em sete horas de reação. Conclui-se, portanto, que o norfloxacino é um composto fotossensível. Apesar disso, comparativamente aos outros POAs, na utilização de radiação UV é necessário elevado tempo para alcançar valores de degradação acima de 80%. Observa-se que em sessenta minutos de reação apenas 50% do norfloxacino havia sido degradado.

Importante salientar que durante o processo de fotólise foi observado o aparecimento de coloração amarelada, indício de produtos de degradação. Esta observação pôde ser comprovada através do espectro de absorção do norfloxacino e dos seus produtos de degradação após extração e concentração em cartucho C₁₈ (Figura 5.17).

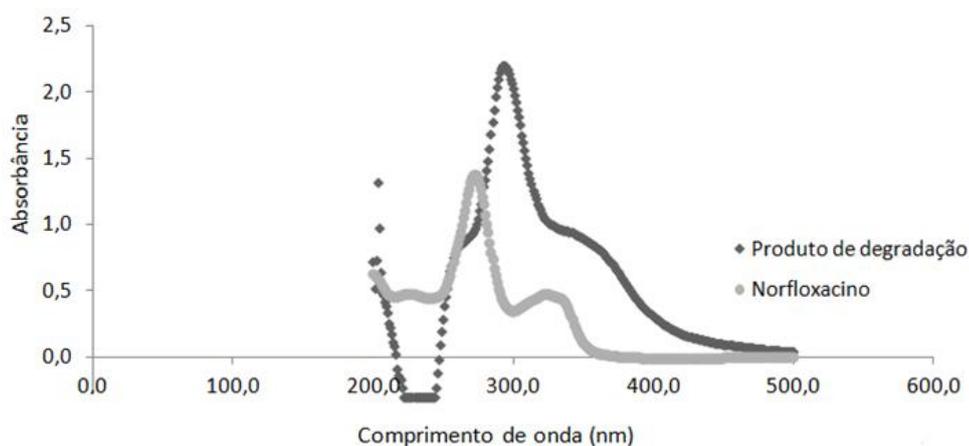


Figura 5.17 – Espectro de absorção do norfloxacino com máximo em 273 nm e dos seus produtos de degradação com máximo em 293 nm

Os dados de COT confirmam a mineralização incompleta do norfloxacino. Em verdade, apenas 2% do composto foi mineralizado (Figura 5.18), evidenciando a necessidade de novas etapas de tratamento. Os resultados encontrados corroboram com os encontrados por CHEN & CHU (2012), em que não foi observada significativa remoção do antibiótico norfloxacino através da utilização de fotólise. A incompleta mineralização do norfloxacino pode levar a formação de compostos recalcitrantes, cujos efeitos tóxicos ao meio ambiente podem ser mais impactantes que os do fármaco de origem.

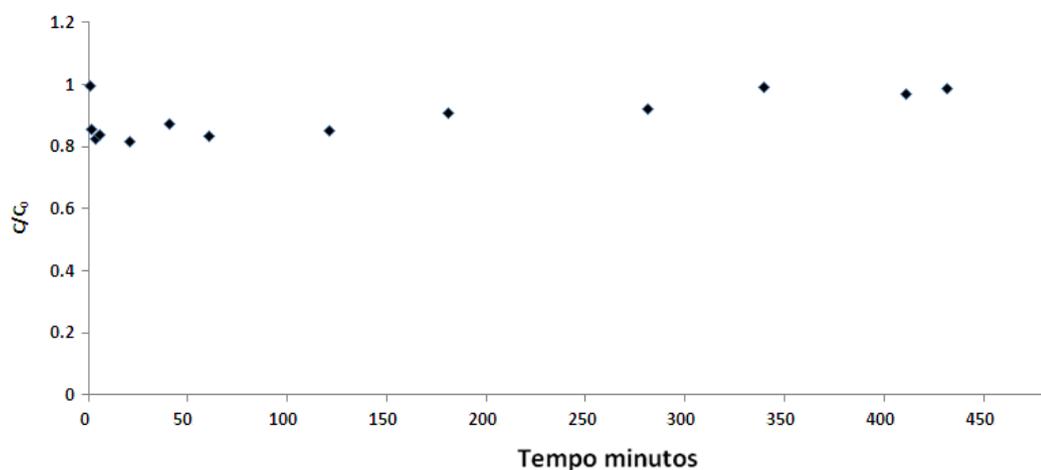


Figura 5.18 – Mineralização do antibiótico norfloxacino por fotólise

A degradação do antibiótico sulfato de gentamicina via fotólise direta foi investigada em pH 7, utilizando-se concentração inicial de 100 mg/L. Os resultados da irradiação UV ao longo do tempo são apresentados na Figura 5.19.

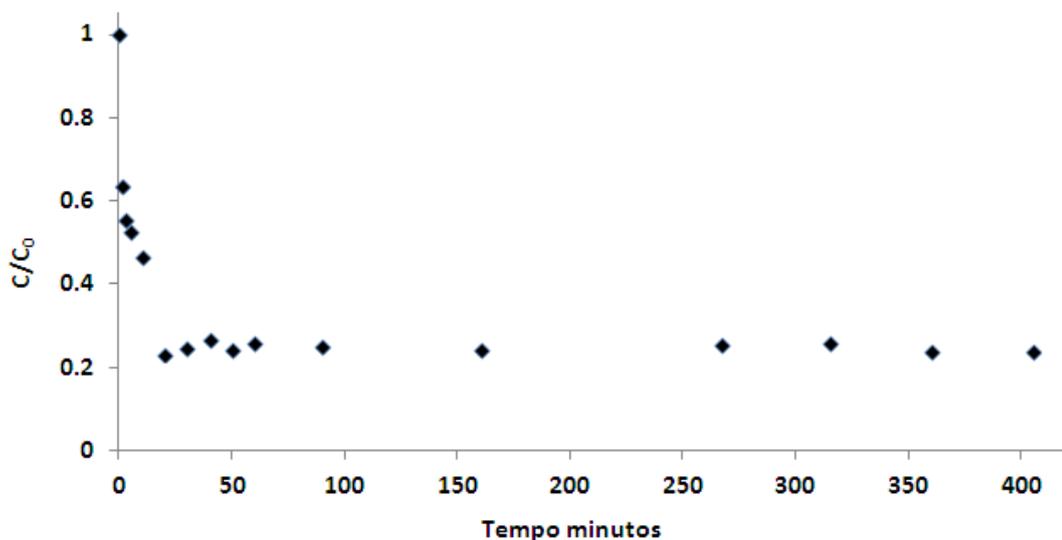


Figura 5.19 – Decomposição determinada por COT do sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta. Condições experimentais: [Sulfato de gentamicina]= 100 mg/L; $C_{inicial}$ = 26,5mg/L; C_{final} = 6,3mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 27°C; pH=7

De forma similar ao apresentado pelo norfloxacino, observa-se uma remoção de, aproximadamente, 80% do antibiótico em sete horas de reação. Conclui-se, portanto, que o sulfato de gentamicina é também um composto fotossensível. Apesar disso, a utilização de radiação UV como forma de remoção deste composto não é recomendada, dado o elevado tempo necessário para alcançar valores de degradação acima de 80%.

5.4.3 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV

Ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização de tratamento por UV. Conforme descrito acima, no caso do norfloxacino, detectou-se a formação de metabólitos secundários durante o processo de tratamento (Figura 5.17). Esses subprodutos são tóxicos de acordo com as análises com o organismo *Aliivibrio fischeri*. Supõe-se que o mesmo tenha ocorrido com o sulfato de gentamicina.

No caso do antibiótico norfloxacino, o valor de toxicidade da amostra final foi CE_{50} (30 min) 7,02% (Figura 5.20). Isso é, os metabólitos gerados durante o processo de degradação do fármaco são mais tóxicos que ele próprio em 273%. Esse resultado aponta para a necessidade de acompanhamento da toxicidade de efluentes durante processos de tratamento, uma vez que a degradação de determinado composto não significa a extinção de sua toxicidade e, ao contrário, pode proporcionar um efluente ainda mais tóxico.

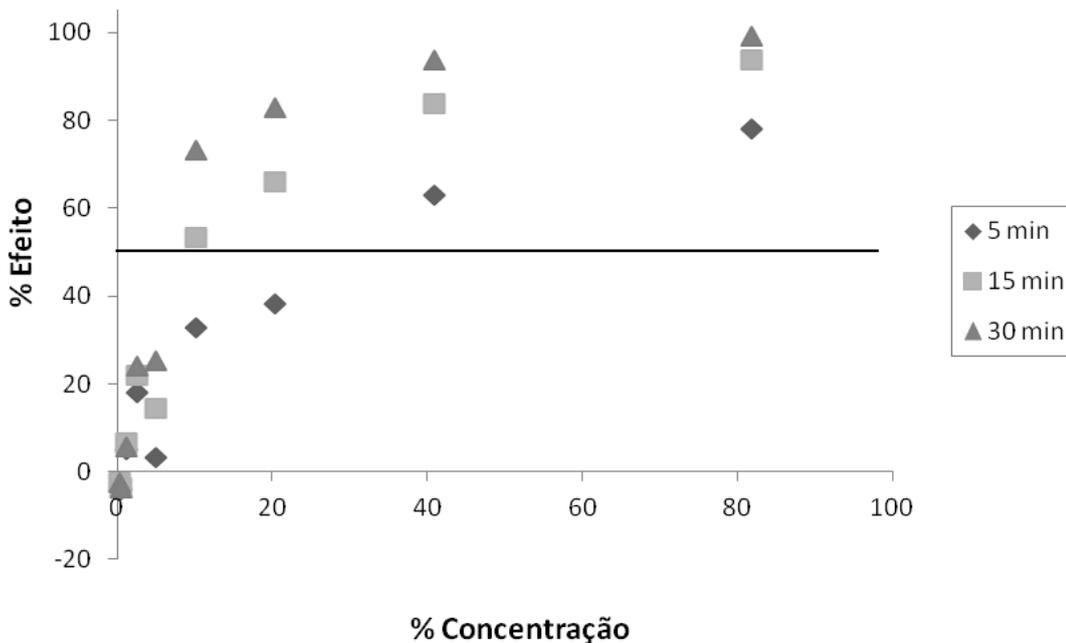


Figura 5.20 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com norfloxacino e submetida a tratamento por UV

Já no caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é ainda mais elevado que o encontrado para o norfloxacino, CE_{50} (30 min) 5,4% (Figura 5.21). É importante trazer a lume que o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não é tóxico, isso significa que o tratamento com radiação UV, por si só, é capaz de atribuir elevada toxicidade ao efluente ao gerar subprodutos tóxicos de degradação.

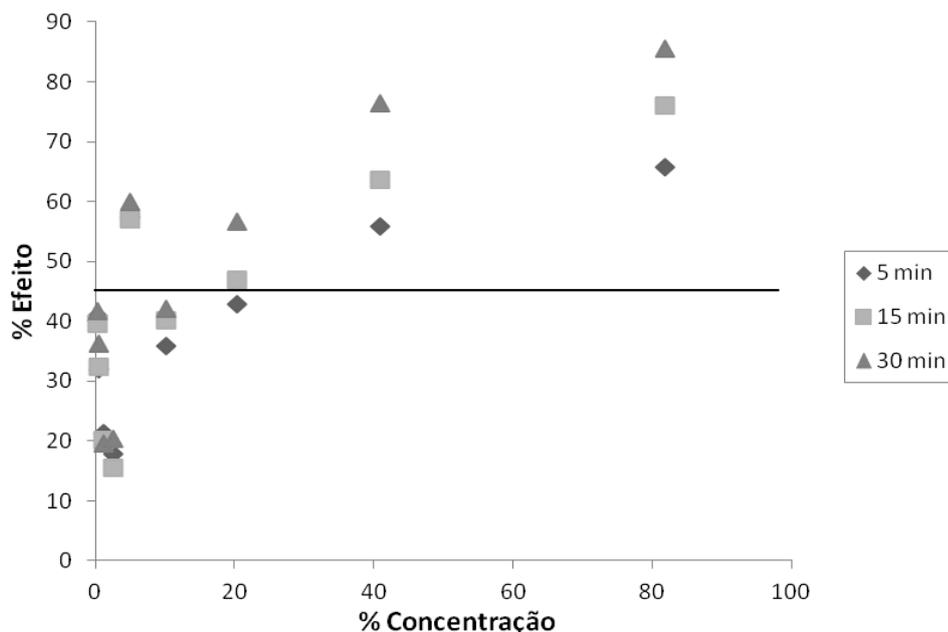


Figura 5.21 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento por UV

Os dados provenientes dos testes de toxicidade esclarecem que, embora o tratamento por UV seja eficiente na degradação do sulfato de gentamicina e norfloxacino após longo tempo de reação, não se trata de uma opção de tratamento viável, isso porque os metabólitos gerados durante o processo apresentam toxicidade muito elevada. Resultados similares foram encontrado por Bonnemoy e colaboradores (2004) ao testarem a toxicidade de herbicidas halogenados da classe fenilureia para *Aliivibrio fischeri*. Os autores esclarecem que, embora esses herbicidas não sejam tóxicos em sua forma original, tornam-se significativamente nocivos após tratamento por UV, devido a formação de produtos de degradação.

5.5 Tratamento por radiação ultravioleta combinada com peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂)

5.5.1 Degradação do norfloxacino e sulfato de gentamicina por UV/H₂O₂

Para otimização das condições experimentais do tratamento por UV/H₂O₂ foram testadas uma série de parâmetros, conforme descrito na metodologia dessa pesquisa. O objetivo foi selecionar a melhor condição de remoção para cada um dos fármacos.

Para o antibiótico norfloxacino, foram realizados testes em que utilizou-se proporções [C]:[OH⁻] de [1]:[1], [1]:[2], [1]:[3], [1]:[4], [1]:[5] e [1]:[6], em pH 7 (Figura 5.22). Considerando-se as faixas de concentrações dos fármacos encontrados em águas e efluentes, o emprego da fotólise do H₂O₂ mostra-se uma alternativa viável, pois nela se utiliza baixas concentrações de oxidante.

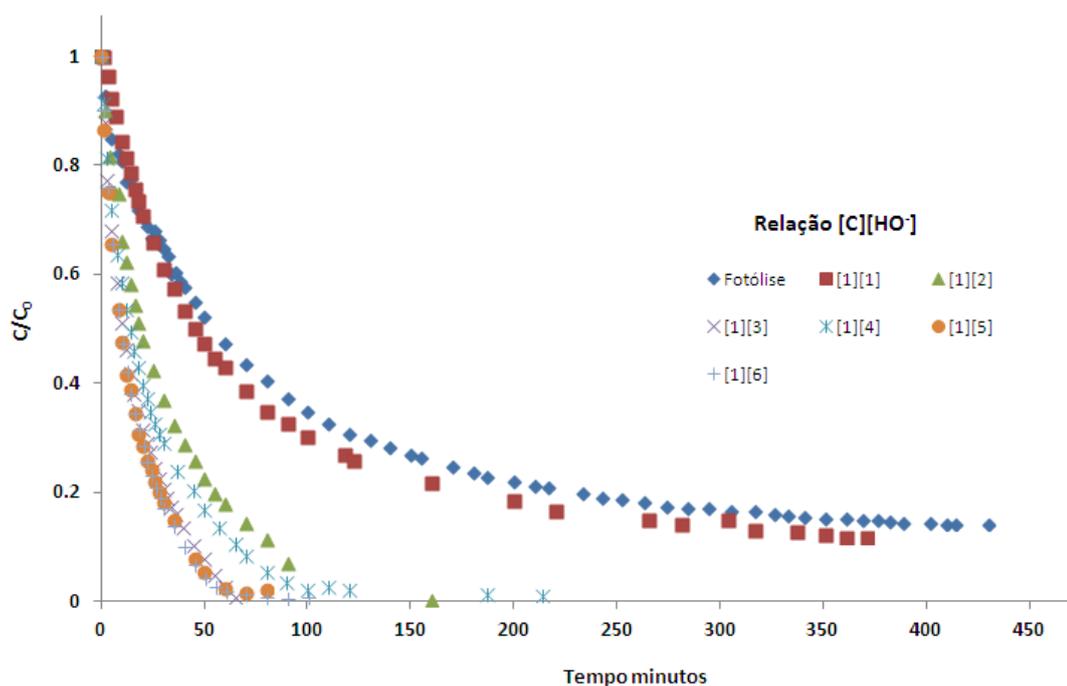


Figura 5.22 – Decomposição do antibiótico norfloxacino através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. Condições experimentais: Norfloxacino_{inicial} = 15 mg/L; Fotólise → Norfloxacino_{final} = 1,5 mg/L; [1]:[1] → Norfloxacino_{final} = 1,2 mg/L; [1]:[2], [1]:[3], [1]:[4], [1]:[5], [1]:[6] → Norfloxacino_{final} = 0 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; pH=7; $\lambda=273$ nm

Através do método de UV/H₂O₂, observaram-se remoções de até 100% do norfloxacino para a maioria das concentrações de H₂O₂ utilizadas. Conforme anotado na Figura 5.22, a medida que a concentração de H₂O₂ é aumentada, acontece notória melhora na taxa de degradação do norfloxacino, isso até a proporção [C]:[OH•] de [1]:[3], a partir da qual não é observado aumento significativo na degradação do antibiótico. Portanto, essa proporção foi a selecionada para otimização do pH da análise a partir de testes em pH 2, 3, 5 e 10 (Figura 5.23).

A citada estabilidade na eficiência da reação está associada ao excesso de peróxido em meio reacional, de forma que um aumento em sua concentração não mais aumentaria a velocidade. A utilização de H₂O₂ em excesso pode ocasionar reações competitivas entre o radical hidroxila (HO•) e o peróxido presente no meio, produzindo um efeito inibitório na degradação dos compostos.

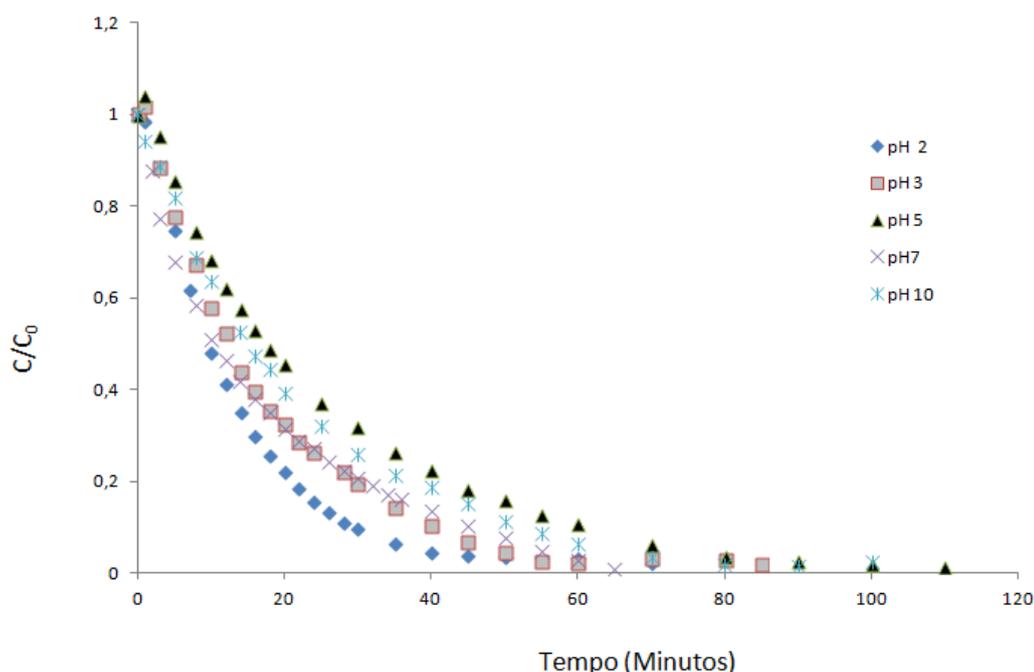


Figura 5.23 – Degradação do norfloxacino através da radiação ultravioleta com proporção [C]:[OH⁻] de [1]:[3] e variação de pH. Condições experimentais: Norfloxacino_{inicial}= 15 mg/L; Norfloxacino_{final}= 0 mg/L Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C; $\lambda=273$ nm

Vários estudos tem demonstrado que o pH reacional influencia na reatividade dos compostos, podendo aumentar ou diminuir a velocidade da reação (BOJANOWSKA-CZAJKA *et al.*, 2006; HOMLOK *et al.*, 2010). No presente estudo, verificou-se que em pH 2 e 3 a degradabilidade do norfloxacino ocorreu mais rapidamente. No entanto, o pH 3 foi o selecionado como condição ideal, uma vez que em pHs muito baixos passam a acontecer reações indiretas com o radical peróxido.

Da mesma forma que ocorrido durante a fotólise direta, também foi observado o aparecimento de coloração amarelada, indício da geração de produtos de degradação. Ainda assim, em termos de eficiência de remoção e velocidade de reação, esse é o tratamento mais adequado para o norfloxacino dentre todos os avaliados.

Já para o antibiótico sulfato de gentamicina, foram realizados testes em que foram avaliadas as proporções [C]:[OH⁻] de [1]:[1], [1]:[2,5] e [1]:[3] em pH 7 (Figura 5.24). Observaram-se remoções do fármaco que variaram de 73% até 88% para as concentrações de H₂O₂ utilizadas. Conforme visualizado na Figura 5.23, a partir dos 60 minutos de teste a proporção [C]:[OH⁻] de [1]:[2,5] é aquela que proporciona as melhores taxas de remoções, chegando a 88% a partir

180 minutos. Portanto, essa proporção foi a selecionada para otimização do pH da análise a partir de testes em pH 3, 7 e 10 (Figura 5.25).

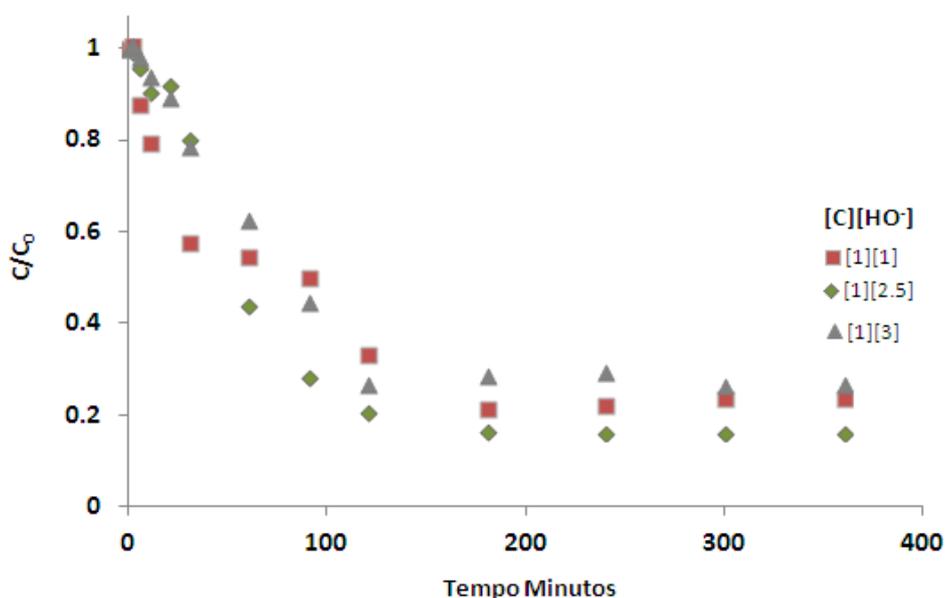


Figura 5.24 – Decomposição do sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta com peróxido de hidrogênio. Condições experimentais: [Sulfato de gentamina] = 100 mg/L; $C_{inicial} = 24,8 \text{ mg/L}$; [1]:[1] $\rightarrow C_{final} = 2,8 \text{ mg/L}$; [1]:[2,5] $\rightarrow C_{final} = 5,8 \text{ mg/L}$; [1]:[3] $\rightarrow C_{final} = 6,4 \text{ mg/L}$; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05} \text{ Einstein/min}$; temperatura: 28°C ; pH=7

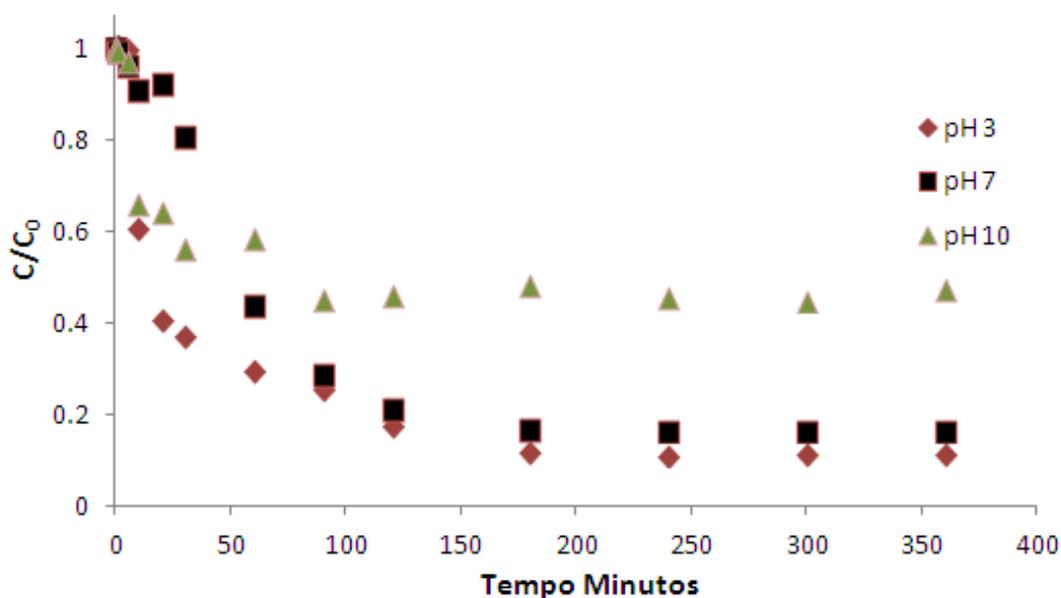


Figura 5.25 – Degradação do sulfato de gentamicina através da radiação ultravioleta utilizando a relação [C][OH·][1][2.5] e variação de pH. Condições experimentais: [Sulfato de gentamina] = 100 mg/L; $C_{inicial} = 24,8 \text{ mg/L}$; pH 3 $\rightarrow C_{final} = 2,8 \text{ mg/L}$; pH 7 $\rightarrow C_{final} = 4,3 \text{ mg/L}$; pH 7 $\rightarrow C_{final} = 11,6 \text{ mg/L}$; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05} \text{ Einstein/min}$; temperatura: 28°C

No caso do sulfato de gentamicina, o pH não apenas influenciou a velocidade da reação, como também a eficiência de remoção do fármaco. Nos pHs 3 e 7, a eficiência da reação é superior àquela verificada em pH 10 (52%). Ressalta-se, ainda, que em pH 3 a eliminação do fármaco

é discretamente superior (89%) que em pH 7 (83%), sendo essa, portanto, a melhor condição reacional.

5.5.2 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por UV/H₂O₂

Ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização de tratamento otimizado por UV/H₂O₂. Muito provavelmente, ocorreu a formação de metabólitos secundários durante o processo de tratamento e esses subprodutos são tóxicos de acordo com as análises com o organismo *Aliivibrio fischeri*.

No caso do antibiótico norfloxacino, o valor de toxicidade da amostra final foi CE₅₀ (30 min) 9,41% (Figura 5.26). Isso é, os metabólitos gerados durante o processo de degradação do fármaco são mais tóxicos que ele próprio em 179%. A formação de produtos de degradação ou metabólitos do antibiótico norfloxacino tem sido amplamente relatada na literatura (PRIETO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012; WAMMER *et al.*, 2013). Estes compostos intermediários são formados durante os processos de tratamento devido a característica refratária das fluorquinolonas.

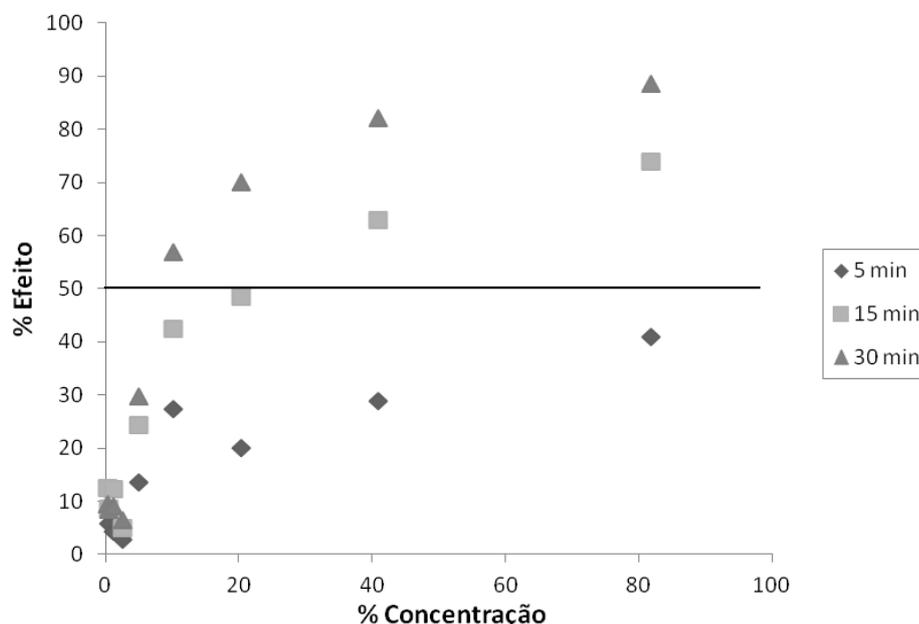


Figura 5.26 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com norfloxacino e submetida a tratamento otimizado por UV/H₂O₂

Já no caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é ainda mais elevado que o encontrado para o norfloxacino, CE₅₀ (30 min) 5,22% (Figura 5.27). Novamente, chama-se atenção para o fato de que o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não é tóxico. Esse

resultado, juntamente com os demais, aponta para o elevado potencial dos POAs gerarem metabólitos tóxicos durante o andamento do tratamento.

Os resultados acima discutidos esclarecem que, embora o tratamento por UV/H₂O₂ seja extremamente eficiente na degradação do sulfato de gentamicina e do norfloxacino, não deve ser considerado uma alternativa viável, uma vez que gera efluentes muito tóxicos. No entanto, esse comportamento não se repete com todos os fármacos, mesmo no caso de outros antibióticos da família das quinolonas. Yuan e colaboradores (2011) testaram a toxicidade de três antibióticos – oxitetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacino – após passarem por tratamento com UV e UV/H₂O₂. Os autores esclarecem que, embora a toxicidade tenha elevado significativamente no tratamento por UV, o mesmo não ocorreu com o UV/H₂O₂. Nesse caso, a toxicidade das amostras aumentou inicialmente, mas ao final da análise gerou-se uma solução atóxica.

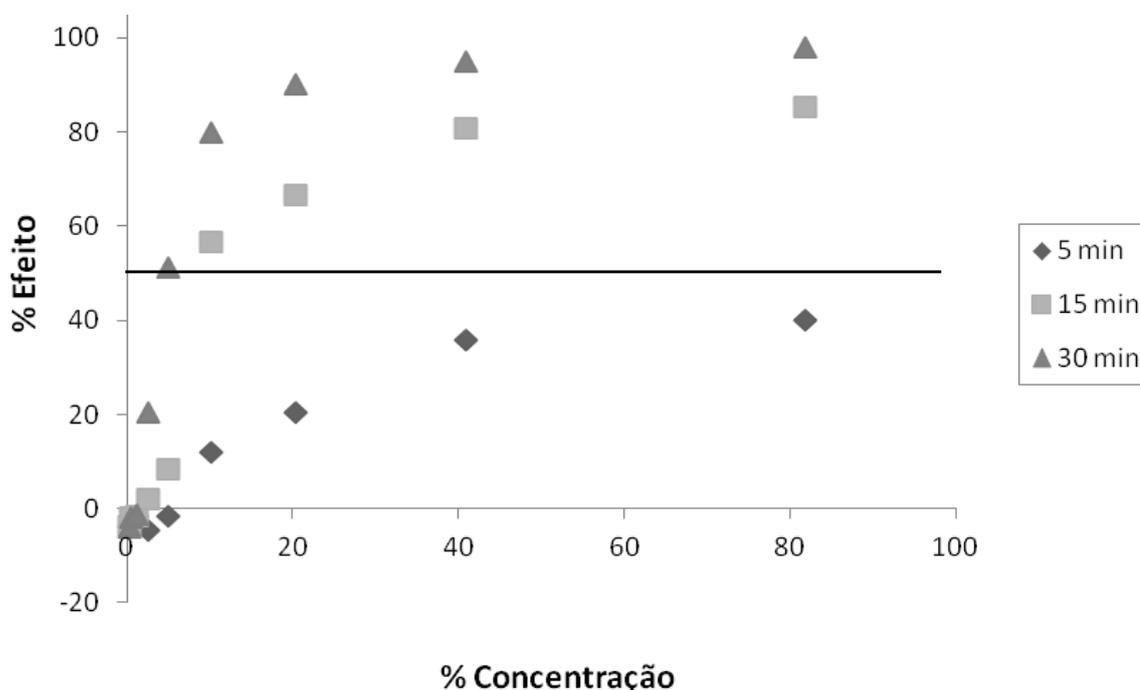


Figura 5.27 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento otimizado por UV/H₂O₂

5.6 Tratamento por Fenton homogêneo

5.6.1 Degradação do norfloxacino e sulfato de gentamicina por Fenton

Os resultados obtidos nos ensaios de Fenton homogêneo para o antibiótico norfloxacino, através do planejamento fatorial, encontram-se descritos na Tabela 5.2. As variáveis monitoradas foram porcentagem de degradação por COT e absorvibilidade em 273 nm.

Tabela 5.2 – Relação entre as eficiências de mineralização e degradação do antibiótico norfloxacino nos ensaios de Fenton por COT e UV/Vis (273nm), respectivamente

Experimentos	Ponto Central	[OH ⁻][Fe ²⁺]	% Degradação COT	% Degradação UV
1	0	[4][2]	35	38
2	1	[2][1]	32	36
3	1	[2][1]	31	33
4	1	[8][4]	36	58
5	1	[8][4]	33	55
6	1	[8][4]	32	56
7	1	[8][1]	53	60
8	1	[2][4]	44	46
9	1	[2][1]	30	35
10	1	[2][4]	41	44
11	1	[8][1]	55	60
12	0	[4][2]	35	39
13	1	[2][4]	42	44
14	1	[8][1]	56	57

Observa-se que a porcentagem de mineralização do norfloxacino nos experimentos é menor que a degradação do fármaco de forma específica, o que sugere a formação de produtos intermediários.

Na Figura 5.28 é possível observar que a maior eficiência de degradação e de remoção de matéria orgânica é verificada com a relação [OH⁻][Fe²⁺] de 8:1, sugerindo que o fator mais relevante para esta remoção é a concentração de H₂O₂. De acordo com Frontistis e colaboradores (2011) e Chan e Chu (2003), a oxidação de Fenton, para alguns fármacos ou compostos recalcitrantes, pode ser explicada pela presença de dois regimes cinéticos distintos, onde maiores concentrações de peróxido de hidrogênio aumentam de forma significativa a velocidade inicial da reação, sendo seguida por uma etapa com velocidade mais lenta.

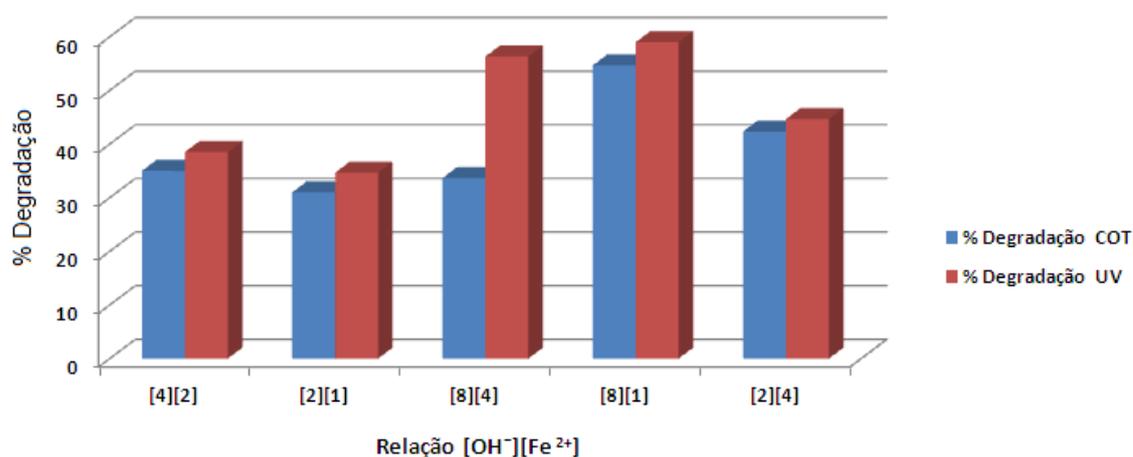


Figura 5.28 – Relação entre as eficiências de mineralização e degradação do antibiótico norfloxacino por COT e UV/Vis nos ensaios de Fenton

Embora o fator mais relevante para maximização da remoção do fármaco seja a elevação da concentração de peróxido de hidrogênio, a adição exagerada desse composto deve ser evitada, pois o peróxido de hidrogênio residual confere toxicidade ao efluente tratado. Os radicais hidroxilas são oxidantes não seletivos e, quando presentes nos efluentes lançados em corpos d'água, poderão oxidar espécies não-alvo, causando um desequilíbrio no ecossistema aquático.

Os resultados obtidos nos ensaios de Fenton homogêneo para o antibiótico sulfato de gentamicina, através do planejamento fatorial, encontram-se descritos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Degradação do antibiótico sulfato de gentamicina por COT nos ensaios de Fenton

Experimentos	Ponto Central	[OH⁻]/[Fe²⁺]	% Degradação COT
1	0	[2.5][2.5]	67
2	1	[1][1]	66
3	1	[1][1]	65
4	1	[4][4]	83
5	1	[4][4]	83
6	1	[4][4]	81
7	1	[4][1]	72
8	1	[1][4]	75
9	1	[1][1]	67
10	1	[1][4]	78
11	1	[4][1]	75
12	0	[2.5][2.5]	69
13	1	[1][4]	79
14	1	[4][1]	74

Na Tabela 5.3 é possível observar que a maior eficiência de remoção de matéria orgânica é verificada com a proporção $[\text{OH}^-][\text{Fe}^{2+}]$ de 4:4. A Figura 5.29 evidencia as porcentagens de degradação do fármaco, por COT, nos ensaios de Fenton.

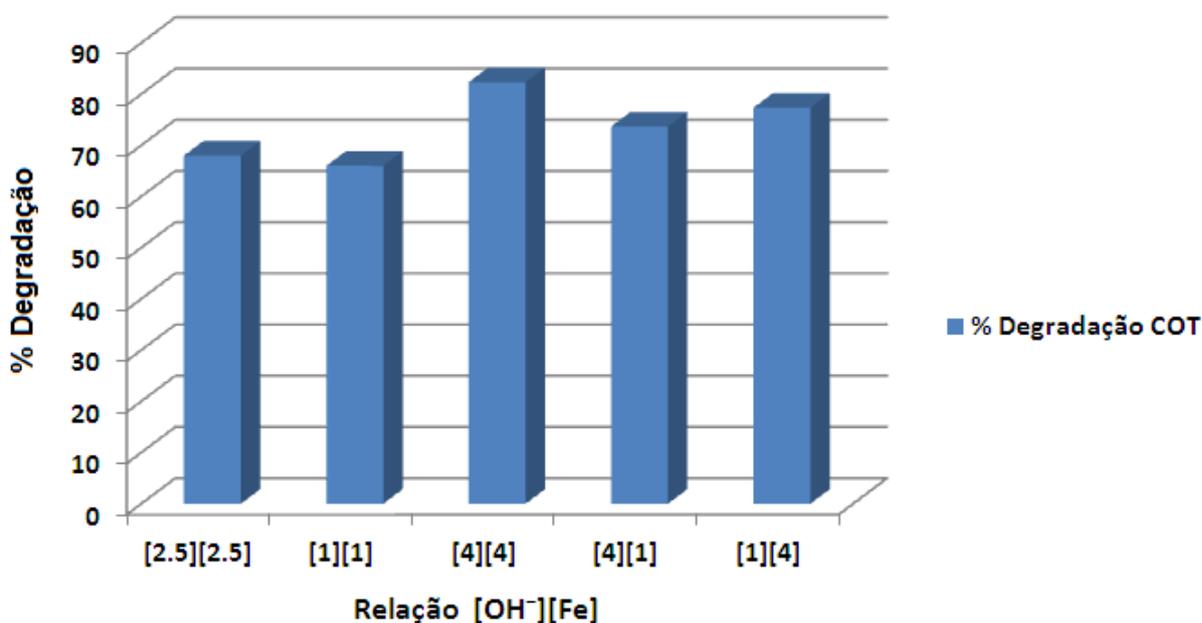


Figura 5.29 – Porcentagem de degradação do antibiótico sulfato de gentamicina por COT nos ensaios de Fenton

Ao contrário do que foi verificado para o antibiótico norfloxacino, no caso do sulfato de gentamicina, observa-se um sinergismo entre as concentrações de peróxido de hidrogênio e íons Fe^{2+} . Esses resultados confirmam que, para cada tipo de fármaco com o qual se deseja trabalhar, é necessário um estudo detalhado de seu comportamento, devido à inexistência de um protocolo ideal.

5.6.2 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por Fenton

Apesar das eficiências de remoção acima descritas, apenas a solução tratada de norfloxacino apresentou-se atóxica. Com relação à toxicidade da solução tratada de sulfato de gentamicina, dentre todos os tratamentos por POAs, esse é o que gera o efluente mais tóxico.

No caso do antibiótico norfloxacino, a amostra final não é tóxica ($\text{CE}_{50} > 81,9\%$), embora tenha havido efeito de inibição de luz sob as bactérias. Nesse caso, os resultados são expressos em “maior porcentagem de efeito”. O maior efeito de inibição de luz observado foi 4,97% em 30 minutos. Isto é, embora a porcentagem de mineralização do norfloxacino nos experimentos seja menor que a degradação do fármaco de forma específica, sugerindo a

formação de produtos intermediários, esses metabólitos formados não são nocivos à bactéria *Aliivibrio fischeri* no teste em 30 minutos.

Levando-se em consideração a eficiência de remoção de 55% e 59% em termos de UV/VIS e COT, respectivamente, além da eficiência na eliminação da toxicidade do norfloxacino, o tratamento por reagente Fenton é uma alternativa viável a ser considerada. É importante, no entanto, destinar e/ou tratar adequadamente o lodo formado durante o processo, uma vez que ele adsorve uma série de contaminantes presentes nos efluentes.

Já no caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é elevado, CE_{50} (30 min) 3,50% (Figura 5.30). Isso significa que, mesmo com altas taxas de remoção do fármaco por COT – cerca de 80% –, os metabólitos formados durante o processo são tóxicos. É necessário ressaltar, ademais, o fato de que o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não é tóxico, ou seja, o tratamento torna a amostra nociva. Uma comparação entre as taxas de degradação do norfloxacino (55%) e do sulfato de gentamicina (82%), em termos de COT, reforçam a importância de testes de toxicidade durante os métodos de tratamento dos mais diversos efluentes, bem como a insuficiência dos métodos físico-químicos de análise para a tomada de decisões.

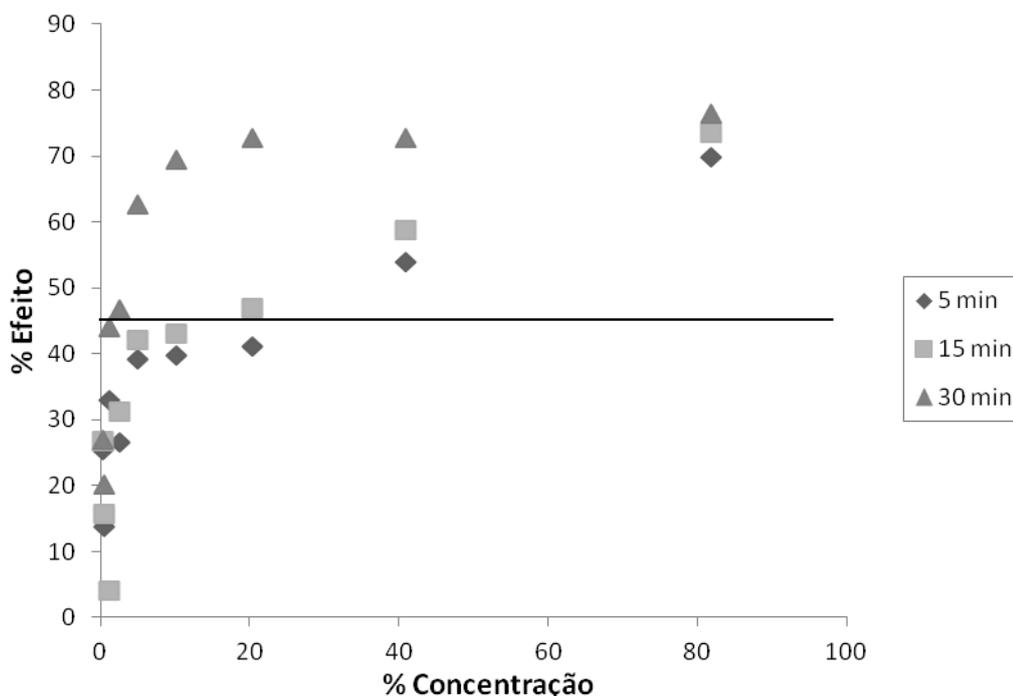


Figura 5.30 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento otimizado por Fenton homogêneo

Finalmente, mesmo havendo significativa porcentagem de remoção para o antibiótico avaliado, o fato desse tratamento gerar o efluente mais tóxico, aliado aos problemas relacionados à geração de lama peculiares ao processo, repercutem na inviabilidade do tratamento para a degradação do sulfato de gentamicina.

Os distintos resultados, em termos de toxicidade, para norfloxacino e sulfato de gentamicina esclarecem que cada resíduo precisa ser testado e monitorado especificamente, um método que se apresente adequado para determinado tipo de contaminante pode se mostrar impróprio para tantos outros. A exemplificar, a eficiência do tratamento por Fenton na remoção da toxicidade de efluente da indústria têxtil (MERICÇ *et al*, 2005) e a ineficiência desse mesmo processo para lixiviados (GOI *et al*, 2010; GOTVAJN *et al*, 2011), em que ocorre aumento na toxicidade das amostras.

5.7 Tratamento por foto-Fenton homogêneo

5.7.1 Degradação do norfloxacino e sulfato de gentamicina por foto-Fenton

Para os ensaios utilizando foto-Fenton, empregou-se as melhores condições analíticas encontrada nos ensaios de Fenton para cada antibiótico, que foram repetidas acrescentando-se a irradiação por UV.

No caso do norfloxacino (Figura 5.31), para o qual a proporção $[\text{OH}^-][\text{Fe}^{2+}]$ foi de 8:1, conseguiu-se atingir taxa de mineralização (COT) de 88% e degradação (UV/Vis) de 65%. O tratamento por foto-Fenton é, portanto, mais eficiente comparado à oxidação por Fenton, mais especificamente, apresenta 49% melhor mineralização e 10% melhor degradação.

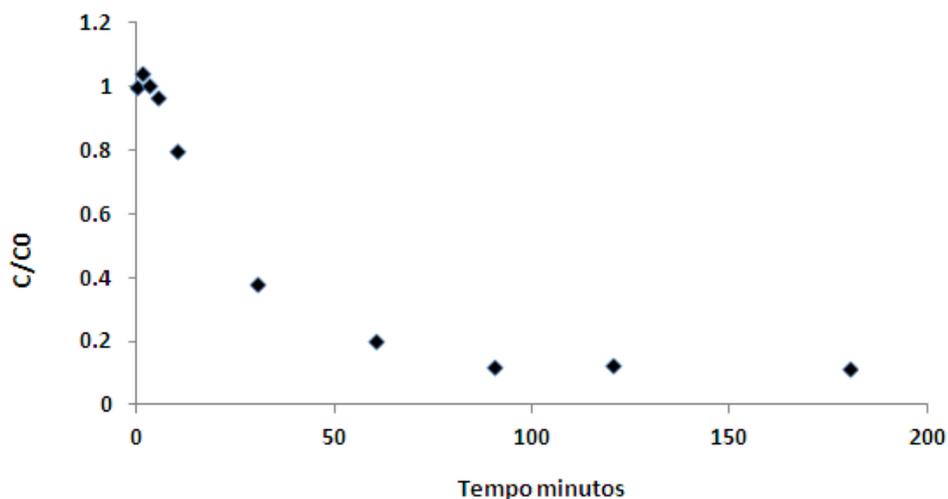


Figura 5.31 – Degradação do antibiótico norfloxacino por foto-Fenton. Condições experimentais: Norfloxacino_{inicial}= 15 mg/L; Norfloxacino_{final}= 5,2 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C, pH 3

No caso do sulfato de gentamicina (Figura 5.32), para o qual a proporção $[\text{OH}^-][\text{Fe}^{2+}]$ foi de 4:4, conseguiu-se atingir taxa de mineralização, em termos de COT, de 93%. Isto é, também nesse caso, o tratamento por foto-Fenton é mais eficiente quando comparado à oxidação por Fenton, mais especificamente em 13%.

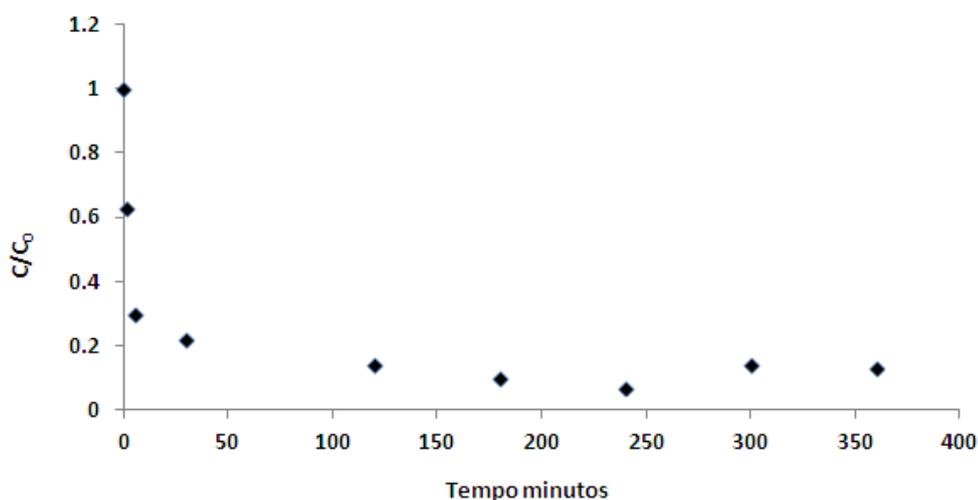


Figura 5.32 – Degradação do antibiótico sulfato de gentamicina por foto-Fenton. Condições experimentais: [Sulfato de gentamicina]= 100 mg/L; C_{inicial}= 17,5 mg/L; C_{final}= 1,2 mg/L; Intensidade da luz: $4,94 \cdot 10^{-05}$ Einstein/min; temperatura: 28°C, pH 3

5.7.2 Análise ecotoxicológica das amostras provenientes do tratamento por foto-Fenton

Ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização de tratamento otimizado por foto-Fenton. Ressalta-se que, em todos os processos oxidativos em que participa a radiação UV, os efluentes gerados são tóxicos, tanto para o sulfato de gentamicina quanto para o norfloxacino.

Esse fato, aliado a outros apresentados pela literatura e citados nesse trabalho, sugere que a presença da citada radiação favorece a formação de subprodutos de degradação tóxicos.

No caso do antibiótico norfloxacino, o valor de toxicidade da amostra final foi CE_{50} (30 min) 17,98% (Figura 5.33), isto é, os metabólitos gerados durante o processo de degradação do fármaco são mais tóxicos que ele próprio em 46%.

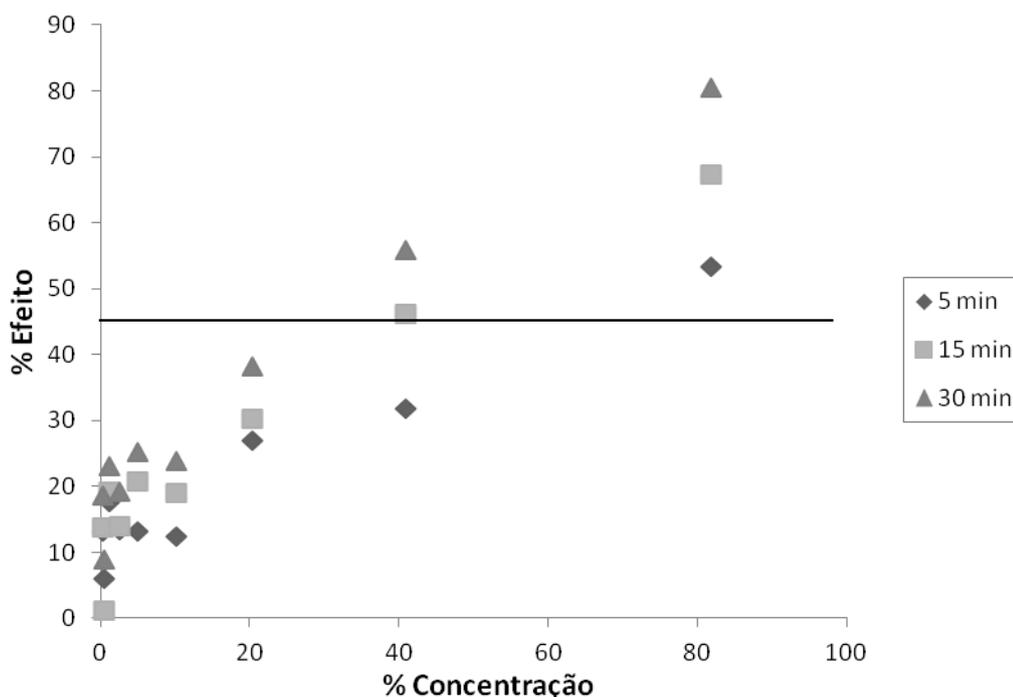


Figura 5.33 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com norfloxacino e submetida a tratamento otimizado por foto-Fenton

No caso do sulfato de gentamicina, o valor de toxicidade da amostra final é ainda mais elevado que o encontrado para o norfloxacino, CE_{50} (30 min) 12,67% (Figura 5.34). Não sendo o sulfato de gentamicina a 100 mg/L tóxico, isto significa que o tratamento por foto-Fenton transforma parte do antibióticos em metabólitos nocivos. Vale mencionar que em todos os processos oxidativos avançados, com exceção daquele com H_2O_2 , a amostra final de sulfato de gentamicina apresenta-se mais tóxica que a de norfloxacino. Sugere-se que a oxidação pelo radical hidroxila ($HO\bullet$) favoreça fortemente a degradação desse aminoglicosídeo em moléculas mais tóxicas.

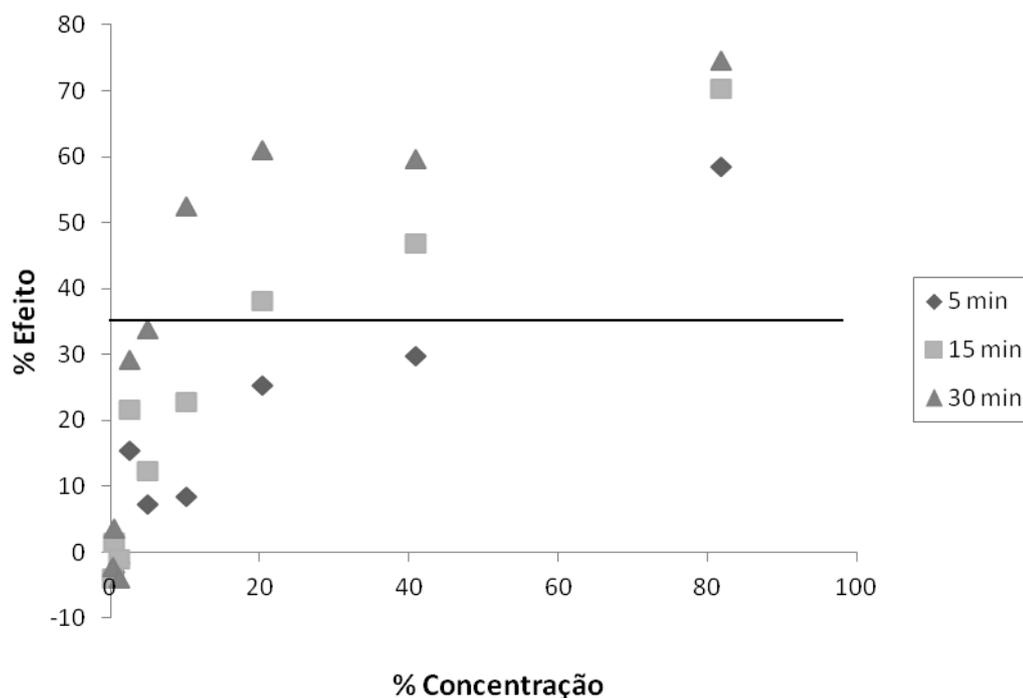


Figura 5.34 – % de efeito (redução de luminosidade) em função da porcentagem de concentração de efluente em 5, 15, 30 minutos em amostra contaminada com sulfato de gentamicina e submetida a tratamento otimizado por foto-Fenton

Importante chamar a atenção para o fato de que embora o processo por foto-Fenton seja mais eficiente que o por Fenton, no caso do norfloxacino, gera-se um efluente mais tóxico. Ressalta-se, portanto, que a amostra contaminada por esse antibiótico deixa de ser tóxica ao ser submetida à oxidação por Fenton e se torna bastante tóxica no tratamento por foto-Fenton. O mesmo não ocorre com o sulfato de gentamicina, em que a amostra final de foto-Fenton é menos tóxica em 262% que a proveniente do tratamento por Fenton. Importante trazer a lume que generalizações não são possíveis nesta seara, uma vez que cada fármaco se comporta de forma diferente frente a um mesmo tratamento. Sabe-se, por exemplo, que o processo por foto-Fenton reduz a toxicidade do antibiótico sulfametoxazol (GONZÁLEZ *et al*, 2007), aumenta a toxicidade da sulfametazina (PÉREZ-MOYA *et al*, 2010) e, no caso da amoxicilina, gera uma amostra tóxica, porém menos nociva que a inicial (TROVÓ *et al*, 2012).

5.8 Avaliação geral

A Figura 5.35 trás os dados de CE_{50} compilados, facilitando a visualização dos efeitos dos tratamentos sob a toxicidade das amostras finais. É importante lembrar que quanto menor o valor de CE_{50} , mais tóxica é a amostra. Observa-se que os processos oxidativos avançados, embora mais eficientes na remoção dos fármacos, tendem a gerar efluentes mais tóxicos ao

degradarem o norfloxacino e o sulfato de gentamicina. Já os tratamentos biológicos anaeróbios, são suficientes para eliminar a toxicidade, no caso do norfloxacino, e de manter a atoxicidade, no caso do sulfato de gentamicina. A figura também facilita a visualização do aumento de toxicidade proporcionado à amostra quando comparamos o tratamento por Lodos ativados não aclimatado com o aclimatado, conforme já discutido no item 5.2 desse trabalho. O gráfico esclarece, ainda, que além dos tratamentos biológicos anaeróbios, o tratamento por H_2O_2 também é capaz de tratar o norfloxacino e o sulfato de gentamicina sem gerar subprodutos tóxicos. O tratamento por Fenton é também capaz de reduzir a toxicidade, mas apenas para o norfloxacino.

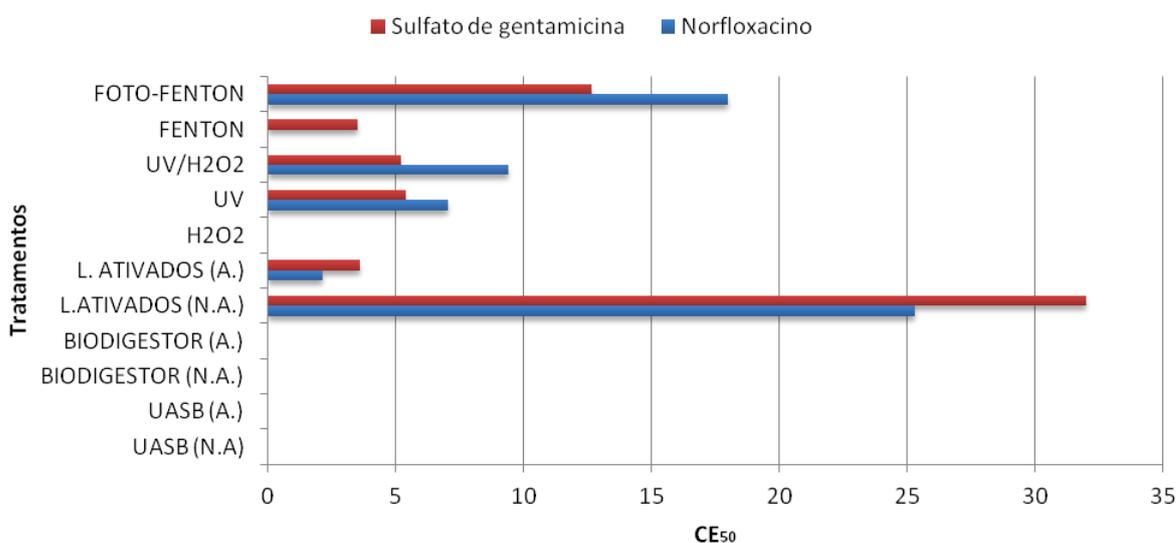


Figura 5.35 – Dados de CE_{50} para *Aliivibrio fischeri* das amostras contaminadas com norfloxacino e sulfato de gentamicina após os diversos tipos de tratamento
 Legenda: N.A.: não aclimatado; A.: aclimatado; $CE_{50}=0$: amostra atóxica

Por serem os processos oxidativos avançados aqueles que geram as amostras mais tóxicas, apresenta-se a figura 5.35, que traz os maiores efeitos de inibição de luz observados nos testes de toxicidade (15 e 30 minutos) com amostras advindas dos cinco POAs avaliados. Conforme esperado, os maiores efeitos de inibição são verificados nos testes mais longos, de 30 minutos, uma vez que a bactéria permanece mais tempo em contato com o contaminante e, por isso, sofre maiores consequências. Além disso, é possível verificar que, embora o CE_{50} das amostras contaminadas com sulfato de gentamicina seja inferior aos daquelas contaminadas com norfloxacino – exceto no tratamento por H_2O_2 –, o maior efeito de inibição observado foi no tratamento por UV em solução de norfloxacino (teste em 30 minutos), que tem valor muito próximo ao apresentado no tratamento por UV/ H_2O_2 em solução de sulfato de gentamicina. Ressalta-se, ainda, que o valor de inibição abaixo de zero, encontrado no tratamento do

solução de sulfato de gentamicina por H₂O₂, corresponde ao desvio positivo característico da *hormesis*. Com exceção desse, o tratamento que gera os menores efeitos de inibição é o de Fenton sob a solução de norfloxacino. No teste em 30 minutos, a média e mediana da maior porcentagem de efeito de inibição é 59 e 66,8, respectivamente, para o norfloxacino; e 61,5 e 76,5, respectivamente, para o sulfato de gentamicina. Isso é, os maiores efeitos de inibição acontecem nas amostras contaminadas com o aminoglicosídeo.

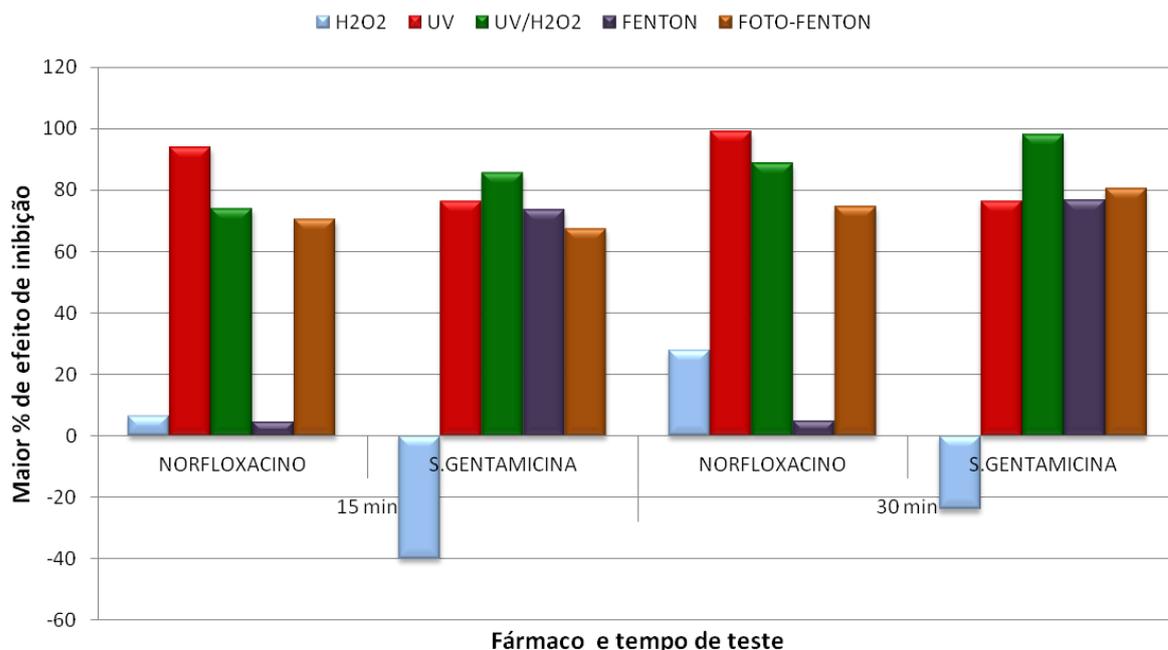


Figura 5.36 – Maior % de efeito de inibição (redução de luminosidade) encontrada em testes de toxicidade com *Alivibrio fischeri* de amostras contaminadas com norfloxacino e sulfato de gentamicina e submetidas a diferentes tipos de POAs

5.9 Análise estatística

Para verificação de uma possível correlação entre a remoção dos fármacos durante os diferentes tratamentos e a toxicidade da amostra final, realizou-se o teste de *Spearman* com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), uma vez que os dados não demonstraram normalidade. O teste esclareceu que não existe correlação significativa entre a remoção de nenhum dos dois fármacos e a toxicidade final das amostras ($p>0,05$). Isso significa dizer que não é apenas a remoção dos antibióticos a responsável pelo aumento ou diminuição da toxicidade das amostras. Muito provavelmente, o principal fator que afeta esse parâmetro é a formação de subprodutos de transformação durante a degradação do norfloxacino e do sulfato de gentamicina. Esses metabólitos formados podem ser altamente tóxicos, por vezes ainda mais nocivos que os contaminantes em sua forma original; esse fenômeno é extensivamente reportado na literatura (FARRÉ *et al*, 2008; MOLKENTHIN *et al*, 2013; ZONK *et al*, 2013).

6 CONCLUSÕES

O efeito ecotoxicológico dos fármacos diluídos em corpos d'água já é reconhecido. O monitoramento da contaminação do meio ambiente por medicamentos é, portanto, aconselhável. Entretanto, muitos desafios se impõem a esse objetivo, um monitoramento completo é difícil devido ao excessivo número existente de fármacos e metabólitos, com diferentes estruturas químicas e propriedades físico-químicas. Além disso, o baixo poder de detecção dos métodos analíticos para substâncias presentes em pequena concentração dificulta a pesquisa na área.

Nesse sentido, os resultados dos estudos ecotoxicológicos são de grande auxílio. Eles podem ser empregados como instrumentos de vigilância no acompanhamento contínuo das condições dos ecossistemas, podendo ser utilizados como marcadores cientificamente aprovados das alterações ambientais significativas. Podem convir, ainda, como instrumentos reguladores, permitindo a proibição ou liberação do uso e descarte de novos fármacos.

A seguir, as principais conclusões proporcionadas por essa pesquisa:

- O norfloxacino a 15 mg/L é tóxico, apresentando CE_{50} (30 min) de 3,9 mg/L. Já o sulfato de gentamicina a 100 mg/L não apresenta toxicidade no teste em 30 minutos, foi detectada *hormesis*.
- Dentre os tipos testados de tratamento biológico, o mais eficiente é aquele que utiliza biomassa proveniente de reator UASB, seguido do Biodigestor Anaeróbio e, por último, Lodos Ativados. No entanto, verificou-se nas três situações que a matéria orgânica biodegradável (glicose) é preferencialmente consumida em relação aos antibióticos, conforme esperado. Quanto aos testes ecotoxicológicos, pode-se dizer que o tratamento biológico através de reator UASB e Biodigestor Anaeróbio são suficientes para eliminar a toxicidade dos antibióticos. Com relação ao processo de Lodos Ativados, todos os efluentes gerados são tóxicos, sobretudo os provenientes de reatores com biomassa aclimatada.
- As análises ecotoxicológicas realizadas com as amostras após término do experimento otimizado de H_2O_2 esclarecem que não há toxicidade remanescente, embora a eficiência de remoção dos fármacos seja muito reduzida. No caso do norfloxacino, a amostra foi

considerada atóxica. Já para o sulfato de gentamicina, encontrou-se *hormesis*, portanto o mesmo resultado da amostra bruta a 100 mg/L.

- O tratamento do sulfato de gentamicina e do norfloxacino por UV é eficiente na degradação dos fármacos, contudo, apenas após longo tempo de reação. Além disso, não ocorre a mineralização completa dos antibióticos durante o processo. Acrescenta-se que, em função da formação de subprodutos de degradação nocivos, ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização do tratamento, não sendo esse portanto um tratamento indicado.
- Através do método de UV/H₂O₂ observou-se remoções de até 100% do norfloxacino e 90% do sulfato de gentamicina, que sugere ser esse um tratamento adequado em termos de eficiência de remoção. Acrescenta-se que, em função da formação de subprodutos de degradação nocivos, ambas as amostras apresentam-se tóxicas após realização do tratamento, não sendo esse portanto um método indicado.
- Os experimentos otimizados por reagente Fenton homogêneo proporcionaram degradações médias de 55% e 59% em termos de UV/VIS e COT, respectivamente, para o norfloxacino e de 82% em termos de COT para o sulfato de gentamicina. O tratamento foi eficiente na eliminação da toxicidade do norfloxacino, porém gerou um efluente de elevada toxicidade a partir do sulfato de gentamicina.
- Embora o tratamento otimizado por foto-Fenton seja mais eficiente que o por Fenton, ambas as amostras finais apresentam-se tóxicas após realização dos ensaios, sobretudo a amostra contaminada com sulfato de gentamicina.
- Ressalta-se que, em todos os processos oxidativos em que participa a radiação UV, os efluentes gerados são tóxicos, tanto para o sulfato de gentamicina quanto para o norfloxacino.
- Os processos mais adequados para manter a atoxicidade do sulfato de gentamicina e eliminar a toxicidade do norfloxacino são o tratamento biológico com biomassa proveniente do reator UASB e o processo oxidativo avançado com uso exclusivo de H₂O₂. O tratamento biológico com biomassa do Biodigestor Anaeróbio também é um método eficaz no caso do sulfato de gentamicina e o tratamento por Fenton homogêneo eficiente no caso do norfloxacino.

7 RECOMENDAÇÕES

No contexto ecológico, os fármacos apresentam elevado poder de ocasionar distúrbios negativos, alterando o desempenho de vários organismos no meio ambiente. Apesar disso, no Brasil, estudos sobre a redução da toxicidade em efluentes contaminados são incipientes e pouca informação está disponível. Como consequência, muito ainda há para ser pesquisado sobre o assunto, sobretudo com relação aos efeitos de exposição crônica aos medicamentos. É necessário, ainda, desenvolver o conhecimento a respeito da eliminação dos fármacos por técnicas de tratamento de água, objetivando encontrar métodos mais adequados e eficientes.

A seguir, algumas recomendações para futuras pesquisas:

- As mesmas análises conduzidas com a bactéria *Aliivibrio fischeri* também seriam realizadas com a macrófita *Lemna minor*. No entanto, em função de dificuldades para adaptação do cultivo da planta em laboratório, não foi possível iniciar os testes com o organismo em tempo hábil. Sugere-se, portanto, desenvolver ensaios ecotoxicológicos com essa espécie no futuro. Além disso, a seleção de um outro organismo-teste para realização das mesmas análises, preferencialmente um consumidor, propiciaria um estudo mais detalhado, no sentido de avaliar o ecossistema da forma menos fragmentada possível.
- Sabe-se que no meio ambiente não são encontradas concentrações muito elevadas de antibióticos. No entanto, em função do limite de detecção dos equipamentos de monitoramento empregados nessa pesquisa, não foi possível desenvolver o trabalho com soluções menos concentradas. Sugere-se, portanto, o desenvolvimento de análises semelhantes às apresentadas nessa dissertação, porém em baixas concentrações.
- Uma série de trabalhos exemplificam a importância de avaliar as misturas entre as substâncias dispostas no ambiente, isso porque, embora os estudos geralmente se dediquem a analisar uma substância separadamente, essa não é a realidade ambiental. Compostos químicos estão sujeitos a interações e modificações, podem misturar-se e um é capaz de potencializar ou anular o efeito tóxico do outro. Por esse motivo, sugere-se o desenvolvimento de pesquisa semelhante a essa, porém avaliando o comportamento ecotoxicológico na mistura entre diferentes fármacos.
- Verificou-se, nessa pesquisa, o aparecimento de subprodutos de degradação dos antibióticos durante os diferentes processos de tratamento descritos. Subprodutos esses

muitas vezes mais tóxicos que o fármaco em sua forma original. Sugere-se, portanto, continuidade dessas análises com novas formas de tratamento (por exemplo, carvão ativado, ozonização, troca iônica, dentre outras) ou, ainda, os mesmos tratamentos, com maiores tempos de reação.

- Apontou-se, ademais, para a importância de se buscar identificar quais são os subprodutos formados durante a degradação dos fármacos durante os diversos processos de tratamento. Muitos desses produtos são ainda mais nocivos que os fármacos em sua forma original, sendo capazes de aumentar consideravelmente a toxicidade das amostras.
- Por último, sugere-se a repetição das análises descritas nessa dissertação com outros fármacos, não apenas antibióticos. Além da pertinência de estudar-se os contaminantes emergentes, seria possível verificar se os comportamentos exibidos pelo norfloxacino e o sulfato de gentamicina se repetem com outros tipos de medicamentos.

REFERÊNCIAS

- ABNT. NBR 12648: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro, 2005.
- ABNT. NBR 15308: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com misidáceos (Crustacea)*. Rio de Janeiro, 2005.
- ABNT. NBR 15350: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de Ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-1: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-2: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-3: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15469: *Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 15470: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em Sedimento – Método de Ensaio com Hyalella spp. (Amphipoda)*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 15499: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de Ensaio com peixes*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 12713: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Daphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 2009.
- ABNT. NBR 13373: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com Ceriodaphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 2010.
- ABNT. NBR 15088: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Peixes*. Rio de Janeiro, 2011.
- AGUINACO, A.; BELTRÁN, F. J.; GARCÍA-ARAYA, J. F.; OROPESA, A. Photocatalytic ozonation to remove pharmaceutical diclofenac from water: Influence of variables. *Chemical Engineering Journal*. 2012.
- ALEXY, R.; KÜMPEL, T.; KÜMMERER, K.; Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere* 57, 505–512, 2004.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A.; DURÁN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quím. Nova*, São Paulo, v.27, n.5, 2004.

ANDREOZZI, R., MAROTTA, R., PAXÉUS, N.. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*, v. 50, p. 1319-1330, 2003.

APHA - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th Edition. American Public Health Association, Washington, DC, 2012.

ARSLAN-ALATON I.; DOGRUEL S.; Pre-treatment of penicillin formulation effluent by advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, v.112, p.105-113, 2004.

BACKHAUS T, GRIMME LH. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, v. 38, p.291-301. 1999.

BAE, S.; KIM, D.; LEE, W. Degradation of diclofenac by pyrite catalyzed Fenton oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.apcatb.2012.12.031> Acesso em: 17 de Janeiro de 2013.

BARTELT-HUNT, S.; SNOW D. D.; DAMON-POWELL T. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in groundwater impacted by livestock waste control facilities. In: World Environmental and Water Resources Congress: Challenges of Change, 2010, Rhode Island. *Anais...* Rhode Island: American Society of Civil Engineers, p.1052-1061, 2010.

I.R. BAUTITZ; R. F. P. NOGUEIRA. Degradation of tetracycline by photo-Fenton process – Solar irradiation and matrix effects. *J. Photochem. Protobiol. A*, v.187, p.33-39, 2007.

BERTOLETTI, E. *Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo*. Série Manuais. São Paulo: CETESB, 2009. 36p.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e legislação pertinente. P. 347-379. In: ZAGATTO, P. A; BERTOLETTI E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima. São Paulo. São Carlos. 478 p.

BIAŁK-BIELIŃSKA, A.; STOLTE, S.; ARNING, J.; UEBERS, U. BOSCHEN, A.; STEPNOWSKI, P.; MATZKE, M. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere*, v.85, p.928-933, 2011.

BOJANOWSKA-CZAJKA, A.; DRZEWICZ, P.; KOZYRA, C.; NALECZ-JAWECKI, G; SAWICKI, J.; SZOSTEK, B.; TROJANOWICZ, M.; Radiolytic degradation of herbicide 4-chloro-2methyl phenoxyacetic acid (MCPA) by irradiation for environmental protection. *Ecotoxicology Environmental Safety* 65, 2065-277, 2006.

BONNEMOY, F.; LAV_EDRINE, B.; BOULKAMH, A. Influence of UV irradiation on the toxicity of phenylurea herbicides using Microtox test. *Chemosphere*, v.54, p.1183–1187, 2004.

BRASIL. CONAMA. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 17 de março de 2005, edição n.53, seção 1, p.58-63.

BRASIL. CONAMA. Resolução 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 13 de maio de 2011.

BOBU, M.; YEDILER, A.; SIMINICEANU, I.; SCHULTE-HOSTEDE, S.; Degradation studies of ciprofloxacin on a pillared iron catalyst. *Applied Catalysis B* 83, p15-23, 2008.

BUSER, H. R., POISER, T., MÜLLER, M. D. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a Lake. *Environmental Science and Technology*, v 32, p. 3449-3456. 1998.

CALABRESE, E. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* V.27. n. 7. P.1451-1474. 2008.

CASTRO, A. V. S.; *Processos Oxidativos Avançados para Tratamento de Águas Ácidas de Refinaria de Petróleo, Tese de M. Sc., PEQ/COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.*

CHAN, K. H.; CHU, W.; Modeling the reaction kinetics of Fenton's process on the removal of atrazine, *Chemosphere* 51,305–31, 2003.

CHANG, E-E.; LIU, T.; HUANG, C.; LIANG, C.; CHIANG, P.; Degradation of mefenamic acid from aqueous solutions by the ozonation and O₃/UV processes. *Separation and Purification Technology* 98, p 123–129, 2012.

CHEN, M.; CHU, W.; Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous solution by visible-light-mediated C-TiO₂ photocatalysis. *Journal of Hazardous Material* 219– 220,183– 189, 2012.

COELHO, A. D. *Degradação dos antiinflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno por ozonização.* 214f. Tese (Doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008

CRUZ, N. L.; GIMENEZ, J.; ESPLUGAS, S.; GRANDJEAN, D.; ALENCASTRO, L. F. ; PULGARÍN, C.; Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge, *Water Research* 46, 1947 -1957, 2012.

- CRUZ, R. M.; *Reativo de Fenton e Foto-Fenton em Efluente de Alta Salinidade*, Tese de M. Sc., PEQ/COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2000.
- DE WITTE, B.; DEWULF, J.; DEMEESTERE, K.; VAN LANGENHOVE, H.; Ozonation and advanced oxidation by the peroxone process of ciprofloxacin in water. *Journal Hazardous Materials* 161, p 701-708, 2009.
- DOMÈNECH, X.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I.; Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogênea; Blesa, M. A., ed.; *Digital Grafic*: La Plata, 2001.
- EGUCHI K., NAGASE H., OZAWA M., ENDOH Y. S., GOTO K., HIRATA K., MIYAMOTO K., YOSHIMURA H. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, v.57, n.11, p.1733-1738, 2004.
- ELMOLLA, E.; CHAUDHURI, M.; Combined photo-Fenton–SBR process for antibiotic wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials* 192, p.1418-1426, 2011
- FARRÉ, M.; PÉREZ, S; KANTIANI, L; BARCELÓ, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v.27, n.11, 2008.
- FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, p.991-1009, 2006.
- FERNICOLA, N.A.G.G.; OLIVEIRA, S. Poluentes Orgânicos Persistentes: POPS. *Série Cadernos de Referência Ambiental*. Salvador, v.13, 2000.
- FIELD, J.; SIERRA, R.; LETTING, G. Ensayos anaerobios. 4º Seminario de depuración de aguas residuales Spain: Valladolid, 1988.
- FRONTISTIS, Z.; XEKOUKOULOTAKIS, N. P.; HAPESHI, E.; VENIERI, D.; FATTAKASSINOS, D.; MANTZAVINOS, D.; Fast degradation of estrogen hormones in environmental matrices by photo-Fenton oxidation under simulated solar radiation. *Chemical Engineering Journal* 178, p 175-182, 2011.
- FULLADOSA, E.; MURAT, J.C.; MARTÍNEZ, M.; VILLAESCUSA, I. Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere* 60, p. 43-48, 2005
- GARTISER S., URICH E., ALEX Y R., KÜMMERER K. Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests. *Chemosphere*, v.67, p.604–613, 2007.
- GEBHARDT W.; SCHRÖDER H.F. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *J. Chromatogr. A*, v.1160, p.34-43, 2007.
- GOI, A.; VERESSININA, Y.; TRAPIDO, M. Fenton Process for Landfill Leachate Treatment: Evaluation of Biodegradability and Toxicity. *Environ. Eng.*, v.136, p.46-53, 2010.

GONZÁLEZ, O.; SANS, C; ESPLUGAS, S. Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *Journal of Hazardous Materials*, v.146, p.459–464, 2007.

GOTVAJN, A.; ZAGORC-KONČAN, J.; COTMAN, M. Fenton's oxidative treatment of municipal landfill leachate as an alternative to biological process. *Desalination*, v.275, p. 269–275, 2011.

GUNNARSSON, L *et al.* Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Pharmaceutical Industry Effluent Diluted 1:500 Affects Global Gene Expression, Cytochrome P450 1A Activity, and Plasma Phosphate in Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 12, p.2639–2647, 2009.

HEINLAAN M.; IVASK A., BLINOVA I., DUBOURGUIER H.C., KAHRU A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*; v. 71, p.1308–1316, 2008.

HIGA, M.H. *Aplicação de ensaios de toxicidade na avaliação da eficiência da radiação ionizante e da adsorção em zeólitas para o tratamento de efluentes coloridos*. Dissertação de Mestrado em Ciências na Área Tecnologia Nuclear. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares -USP. São Paulo-SP, 2008

HOLM J. V., RUGGE K., BJERG P. L., CHRISTENSEN T. H. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill, Grindsted, Denmark. *Envir on Sci Techno*; v. 29, n. 5, p. 1415, 1995.

HOMLOK, R.; TAKACS, E. WOJNAROVITS, L.; Radiolytic degradation of 2,4-ichlorophenoxyaceticacid in dilute aqueous solution: pH dependence. *J. Radioanal Nucl Chem*; 284:415–9, 2010.

HÖRSING, M.; KOSJEK, T.; ANDERSEN, H.; HEATH, E.; LEDIN, A.; Fate of citalopram during water treatment with O₃, ClO₂, UV and fenton oxidation. *Chemosphere* 89, p 129-135, 2012.

Huber, M.M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Lö ffler, D., McArdell, C.S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T.A., von Gunten, U. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. *Environmental Science and Technology*. v. 39, n.11 , p.4290–4299, 2005.

JUNG, Y. J.; KIM, W. G.; YOON, Y.; KANG, J.; HONG, Y. M.; KIM, H. W.; Removal of amoxicillin by UV and UV/H₂O₂ processes. *Science of the Total Environment* 420, p160–167, 2012.

KAISER, K.; Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data of other organisms. *Environmental Heath Perspectives Supplements*. v. 106, n. 2, p.583-591, 1998.

KAISER, K; MCKINNON, M.; FORT, F.; Interspecies toxicity correlations of rat, mouse and *Photobacterium phosphoreum*. *Enviromental toxicity and chemistry*, v.13, p. 1599-1606, 1994.

KAISER, K.; PALAPRICA, V.; *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. *Water Pollution Research Journal of Canada*, v.26, n. 3, p.363-431, 1991.

KANG, Y. W.; HWANG, K.; Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process. *Water Research*, v.34, n.10, p.2786-2790, 2000.

KIM, Y.; CHOI, K.; JUNG, J.; PARK, S.; KIM, P.; PARK, J. Aquatic toxicity of cetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, v.33, p.370–375, 2007.

KRAUSE, L. G. T. *Degradação do antibiótico sulfametoxazol por ozonização e Avaliação da atividade antimicrobiana*. 92f. Tese (Doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

KUNGOLOS, A. et al. Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *daphnia magna* and *vibrio fischeri*. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 4, p.101–110, 2004.

KÜSTER, E.; DORUSCH, F.; ALTENBURGER, R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus Vacuolatus* and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n.10, p. 2621–2629, 2005.

LAJEUNESSE, A.; SMYTH, S. A.; BARCLAY, K.; SAUVE, S.; GAGNON, C.; Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Research* 46, p 5600-5612, 2012.

LARCHER, S.; DELBÈS, G.; ROBAIRE, B.; YARGEAU, V.; Degradation of 17 α -ethinylestradiol by ozonation — Identification of the by-products and assessment of their estrogenicity and toxicity. *Environment International* 39, p 66-72, 2012.

LARRSON, D. G. J.; PEDRO C.; PAXEUS N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, v.148, p. 751-755, 2007.

LI, W.; NANABOINA, V.; ZHOU, Q.; KORSHIN, G. V.; Effects of Fenton treatment on the properties of effluent organic matter and their relationships with the degradation of pharmaceuticals and personal care products. *Water Research* 46, p 403-412, 2012.

LI D., YANG M., HU J., ZHANG Y., CHANG H., JIN F. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research*, v.42, p.307-317, 2008

LINDBERG, R.; OLOFSSON, U.; RENDAHL, O.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B. A. V.; Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science Technology* 40 (3), 1042-1048, 2006.

LINDBERG, R.H.; WENNBERG, P.; JOHANSSON, M.I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B.A.V.; Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in

- five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology* 39 (10), 3421-3429, 2005.
- LIU, C.; NANABOINA, V.; KORSHIN, G. V.; JIANG, W. Spectroscopic study of degradation products of ciprofloxacin, norfloxacin and lomefloxacin formed in ozonated wastewater. *Water Research*, v.46, p. 5235-5246, 2012.
- LIU, C.; NANABOINA, V.; KORSHIN, G. Spectroscopic study of the degradation of antibiotics and the generation of representative EfOM oxidation products in ozonated wastewater. *Chemosphere* 86, p. 774-782, 2012.
- LÖFFLER, D. *et al.* Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/ Sediment Systems. *Environmental Science Technology*., v.39, p.5209-5218, 2005.
- MACKEN, A. A test battery approach to the ecotoxicological valuation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicology*, v.18, p.470–480, 2009.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A S. A ecotoxicologia como ferramenta para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* v.13, n.3, p.355-381, 2008.
- MANFRA, L. *et al.* Metal Content and Toxicity of Produced Formation Water (PFW): Study of the Possible Effects of the Discharge on Marine Environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.53, p.183–190, 2007.
- MARQUES, C. R. *et al.* Ecotoxicological effects of MIKADO and VIPER on *Algae* and *Daphnids*. *Environmental Toxicology*, Março 2011.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, v. 157, p.2893–2902, 2009.
- MASCOLO, G.; BALEST, L.; CASSANO, D.; LAERA, G.; LOPEZ, A.; POLLICE, A.; SALERNO, C.; Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment. *Bioresource Technology* 101, p2585–2591, 2010.
- MBOULA, V. M.; HEQUET, V.; GRU, Y.; COLIN, R.; ANDRÈS, Y.; Assessment of the efficiency of photocatalysis on tetracycline biodegradation. *Journal of Hazardous Materials* 209– 210, p 355– 364, 2012.
- MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P.; Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados, *Química Nova*, Vol. 32, No. 1, 188-197, 2009.
- MÉNDEZ-ARRIAGA, F.; OTSU, T.; OYAMA, T.; GIMENEZ, J.; ESPLUGAS, S.; HIDAKA, H.; SERPONE, N.; Photooxidation of the antidepressant drug Fluoxetine (Prozac®) in aqueous media by hybrid catalytic/ozonation processes. *Water Research* 45, p 2782-2794, 2011.

MERICÇ, S.; SELÇUK, H.; BELGIORNO, V. Acute toxicity removal in textile finishing wastewater by Fenton's oxidation, ozone and coagulation–flocculation processes. *Water Research*, v.39, p.1147–1153, 2005.

MINAS GERAIS. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário do Executivo*, Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, MG, 05 de Maio de 2005.

MONTEIRO, J. G.; BRANDÃO, F.; OSSWALD, W.; GUIMARÃES, S.; *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*, 4ª Edição, Porto Editora, Porto, p 863-871, 2001.

MOLKENTHIN, M.; OLMEZ-HANCI, T; JEKEL, M.; ARSLAN-ALATON, I. Photo-Fenton-like treatment of BPA: Effect of UV light source and water matrix on toxicity and transformation products. *Water Research*, v.47, p.5052-5064, 2013.

MUNKTTRICK, K.; POWER, E.; SERGY, G. The relative sensitive oh Microtox, daphnid, rainbow trout and fathead minnow acute lethality test. *Toxicity Assays*, v.6, p. 35-62, 1991.

MUROV, S. L.; *Handbook of Photochemistry* . New York: Marcel Dekker, p 119, 1973.

NEYENS, E.; BAEYENS, J.; “A review of classic Fenton's peroxidations as an advanced oxidation technique”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 98, pp. 33-50, 2003.

OECD. Detailed review paper on biodegradability testing environment monograph N° 98, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Overcoming Antibiotic Resistance, World Health Organization Report in Infectious Diseases*. OMS, Geneva. 2000

PALMA, P. et al. Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bull Environ Contam Toxicol*, v.81, p.485–489, 2008.

PARK, G. S. et al. Ecotoxicological Evaluation of Sewage Sludge Using Bioluminescent Marine Bacteria and Rotifer. *Ocean Science Journal*, v. 40, N. 2, p.91-100, 2005.

PÉREZ-MOYA, M.; GRAELLS, M.; CASTELLS, G.; AMIGO, J.; ORTEGA, E.; BUHIGAS, G.; PÉREZ, L.; MANSILLA, H. Characterization of the degradation performance of the sulfamethazine antibiotic by photo-Fenton process. *Water Research*, v.44, p.2533–2540, 2010.

PLAA, G.L.; HEWITT W.R. Toxicology of the liver. *Raven Press*, New York, p.103-210, 1982.

PRIETO, A.; MÖDER, M.; RODIL, R.; ADRIAN, L.; MARCO-URREA, E.; Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products, *Bioresource Technology* 102,10987–10995, 2011.

POOLE, A. J.; "Treatment of biorefractory organic compounds in wool scour effluent by hydroxyl radical oxidation." *Water Research* 38 (14-15): 3458-3464, 2004.

QUINN, B., GAGNÉ, F., BLAISE, C. The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of The Total Environment*, v. 402, p. 62-69, 2008

RAND, G. M. & S.R. PETROCELLI. *Fundamental of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 666p, 1985.

RASGALLA JR., C.; NOLDIN, J.A.; SANTOS, A. L.; SATO, G. EBERHARDT, D. S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpas (*Cyprinus carpio*). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 12, p. 59-68, 2002.

REICHWALDT, E.; ZHENG, L.; BARRINGTON, D.; GHADOUANI, A. Acute Toxicological Response of Daphnia and Moina to Hydrogen Peroxide. *Environ. Eng.*, v.138, p.607-611, 2012.

RICHARDSON, M. L., BOWRON, J. M.. The fate of pharmaceutical chemicals in the environment. *Journal Pharm. Pharmacol.*, v. 37. p. 1-12, 1985.

RIVAS ,F.J.; GIMENO, O. T.; CARBAJO, B. M.; UV-C radiation based methods for aqueous metoprolol elimination. *Journal of Hazardous Materials* 179, 357–362, 2010.

SÃO PAULO. Resolução SMA nº 03, de 22/02/2000. Implementa o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo. Diário Oficial do Estado, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, SP, 22 de fevereiro de 2000.

SILVA, M.A.R *et al*. Environmental impact of industrial sludge stabilization/solidification products: Chemical or ecotoxicological hazard evaluation? *J. Hazard. Mater.* v.192, n.3, p.1108-1113, 2011.

SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B.; Fluorquinolonas X Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária - Artigo de Revisão. *Arq. Inst. Biol*, São Paulo, v.77, n.2, p.363-369, 2010.

STACKELBERG, P. E. *et al*. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of the Total Environment*, v.329, p.99–113, 2004.

STEAD, D. A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *Journal of Chromatography B*, v. 747, p. 69-93, 2000.

STOLTE, S.; STEUDT, S.; AREITIOAURTENA, O.; PAGANO, F.THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P.; IGARTUA, A. Ionic liquids as lubricants or lubrication additives: An ecotoxicity and biodegradability assessment. *Chemosphere*, 89, 1135–1141, 2012

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. Polar Drug Residues in Sewage and Natural Waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science Total Environmental*, v. 225, n. 1-2, p. 135-141, 1999

TAMBOSI, J. L. *Remoção de fármacos e avaliação de seus Produtos de degradação através de Tecnologias avançadas de tratamento*. 141f. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

TERNES, T.A.. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, v. 32, n. 11, p. 3245–3260. 1998.

TROVÓ, A.G., MELO, S.A., NOGUEIRA, R.F.P., Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process e application to sewage treatment plant effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, v. 198, n. 2-3, p. 215-220, 2008.

TROVÓ, A. G. ; NOGUEIRA, R. F. P.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; MALATO, S.; Paracetamol degradation intermediates and toxicity during photo-Fenton treatment using different iron species, *Water Research* 46, p 5374-5380, 2012.

THOMULKA K.W. & MCGEE D.J. Detection of biohazardous materials in water by measuring bioluminescence reduction with the marine organism *Vibrio harveyi*. *Environ Sci Health*, v. 28, p. 53-66. 1993.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.1, p.151-173, 1977.

TURNER K. S., HARDY M. A., TAPPER R. J. Water-quality reconnaissance of the perimeter of the Rolling Knoll landfill near Green Village, New Jersey, and electromagnetic survey of the parts of the landfill within the Great Swamp National Wildlife Refuge. *US Geological Survey Open-File*, p.92-153, 1993.

URBANCZYC, H.; AST, J.; HIGGINS, M.; CARSON, J.; DUNLAP, P. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., . comb. nov., *Aliivibrio logei* com. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2007), 57, 2823–2829.

U.S.EPA. *Handbook for sampling and sample preservation of water and wastewater*. Cincinnati, Ohio: U.S.EPA, 402p., 1982.

U.S.EPA. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5 ed. Washington, D.C.: U.S.EPA, 266p., 2002a.

U.S.EPA. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4 ed. Washington, D.C.: U.S.EPA, 335p., 2002b.

VALCÁRCEL, Y.; MARTÍNEZ, F.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; SEGURA, Y.; CATALÁ, M.; MOLINA, R.; MONTERO-RUBIO, J. C.; MASTROIANNI, N.; LÓPEZ DE ALDA, M.; POSTIGO, C.; BARCELÓ, D.; Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environment International* 41, p 35-43, 2012.

VOGNA, D.; MAROTTA, R.; ANDREOZZI, R.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M.; Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere*, 54, 497, 2004a.

VOGNA, D.; MAROTTA, R.; NAPOLITANO, A.; ANDREOZZI, R.; D'ISCHIA, M.; Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ an ozone. *Water Research* 38, 414-422, 2004b.

WAMMER, K. H.; KORTE, A. R.; LUNDEEN, R. A.; SUNDBERG, J. E.; MCNEILL, K.; ARNOLD, W. A.; Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin, *Water Research* 47, 439-448, 2013.

WEBB, S.F. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. In: Kummerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer-Verlag, Berlin, p.319–343. 2001

YANG, L *et al.* Growth-inhibition effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, n.5, p. 1201-1208, 2008.

YOSHIMURA, H. & ENDOH, Y. R. Acute Toxicity to Freshwater Organisms of Antiparasitic Drugs for Veterinary Use. *Environ. Toxicol.*, v. 20, p. 60-66. 2005.

YU, M.H. *Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants*, 2nd ed., CRC Press: Boca Raton, 2005.

YUAN, F.; HU, C. HU, X.; WEI, D; CHEN, Y.; QU, J. Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H₂O₂ process. *Journal of Hazardous Materials*, v.185, p.1256–1263, 2011.

ZHAO, I.; WHANG, L.; ZHANG, Z. Quantitative structure-activity relationships. Relationship between toxicity of organic chemicals to fish and to *Photobacterium phosphoreum*. *Chemosphere*, v.26, p.1971-1979, 1993.

ZONG, W., SUN, F. SUN, X. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H₂O₂: Toward the generative mechanism and biological toxicity. *Water Research*, v.47, p.3211-3219, 2013.

APÊNDICE A

Publicações e artigos submetidos do grupo de trabalho SIGERS, com foco na remoção de fármacos

PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS

7º Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados

Título: Avaliação da toxicidade de amostra aquosa bruta contaminada com sulfato de gentamicina e tratada por processo de ozonização
Autores: Danusa Teixeira, Raquel Jacob, Lucilaine Santos, Rachel Santos, Lucas Santos, Liséte Lange

7º Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados

Título: Utilização de processos oxidativos avançados no tratamento do antiótico norfloxacino
Autores: Raquel Jacob, Danusa Teixeira, Liséte Lange

27º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental

Título: Análise ecotoxicológica com *Vibrio Fischeri* de efluentes brutos e tratados contaminados com sulfato de gentamicina e norfloxacino
Autores: Raquel Jacob, Danusa Teixeira, Lucilaine Santos, Liséte Lange

27º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental

Título: Avaliação da toxicidade de efluente bruto contaminado com norfloxacino e tratado por processo de ozonização
Autores: Danusa Teixeira, Raquel Jacob, Lucilaine Santos, Liséte Lange

27º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental

Título: Avaliação da degradação do norfloxacino de efluente sintético por oxidação via oxigênio e ozônio, variando os fluxos de gás e as condições de pH
Autores: Danusa Teixeira, Raquel Jacob, Lucilaine Santos, Liséte Lange

SUBMISSÕES PARA REVISTAS

Water Science and Technology

Título: Evaluation of the aerobic and anaerobic biodegradability of the antibiotic norfloxacin
Autores: Lucilaine Santos, Danusa Teixeira, Raquel Jacob, Míriam Amaral, Liséte Lange

Water Science and Technology

Título: Evaluation of the toxicity of gross aqueous samples containing gentamicin sulfate and treated by ozonation process
Autores: Danusa Teixeira, Raquel Jacob, Lucilaine Santos, Rachel Santos, Lucas Santos e Liséte Lange

Journal of Environmental Management

Título: Degradation of norfloxacin by Fenton, UV and UV/H₂O₂
Autores: Lucilaine Santos, Alexandre Meireles, Liséte Lange