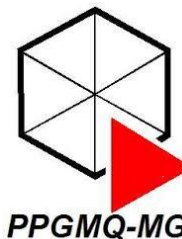




UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química
de Minas Gerais (PPGMQ-MG-UFOP)



TESE DE DOUTORAMENTO

**Remoção de Antibióticos em Efluentes Secundários Utilizando
Fotobiorreatores Microalgas-Bactérias**

Daniel Aparecido da Silva Rodrigues

Ouro Preto, MG

2020

Daniel Aparecido da Silva Rodrigues

Remoção de Antibióticos em Efluentes Secundários Utilizando Fotobiorreatores
Microalgas-Bactérias

Defesa da Tese de Doutorado apresentado como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais (PPGMQ-MG/UFOP).

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal da Fonseca Santiago

Ouro Preto, MG

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R696r Rodrigues, Daniel Aparecido da Silva .
Remoção de antibióticos em efluentes secundários utilizando
fotobiorreatores microalgas-bactérias. [manuscrito] / Daniel Aparecido da
Silva Rodrigues. - 2020.
166 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso.

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal da Fonseca Santiago.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Departamento
de Química. Programa de Pós-Graduação em Multicentrico em Química
de Minas Gerais.

Área de Concentração: Química Analítica.

1. Biodegradação. 2. Antibióticos. 3. Cinética química . 4. Resistência
a medicamentos . I. Afonso, Robson José de Cássia Franco. II. Santiago,
Aníbal da Fonseca. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 543.9

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Aparecido da Silva Rodrigues

Remoção de antibióticos em efluentes secundários utilizando fotobiorreatores microalgas-bactérias

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutor

Aprovada em 07 de dezembro de 2020

Membros da banca

Doutor- Robson José de Cassia Franco Afonso - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutor - Aníbal da Fonseca Santiago - Coorientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutor - Alberto José Delgado dos Reis - Laboratório Nacional de Energia e Geologia (Portugal)
Doutor - Rodinei Augusti - Universidade Federal de Minas Gerais
Doutor - Emanuel Manfred Freire Brandt - Universidade Federal de Juiz de Fora
Doutora - Silvana de Queiroz Silva - Universidade Federal de Ouro Preto

Robson José de Cassia Franco Afonso, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 19/01/2021



Documento assinado eletronicamente por **Robson Jose de Cassia Franco Afonso, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/01/2021, às 19:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0125174** e o código CRC **9B544BF5**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Joana e Juarez, pelo amor incondicional e por sempre depositarem sua confiança em mim. Tenho certeza que suas orações me ajudaram muito nos momentos de incerteza ao longo desta jornada. Agradeço ao meu irmão, Eduardo, por me apoiar e se mostrar disponível a me ajudar no que for necessário. Agradeço a Camila pela cumplicidade, convivência e incentivo. Tenho certeza que a sua companhia diária facilitou a realização deste trabalho.

Sou imensamente grato a todos que contribuíram de alguma forma para concretização desse projeto. Em especial, aos companheiros do Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas (LabMassas): André, Camila Ferreira, Mylena, Daiana, Paulo Bernardo, Alexandre, Joane, Nádia, Rafa e Ananda. Com certeza, sem a ajuda de vocês nada disso seria possível. André e Camila obrigado por não medirem esforços para me ajudar a conquistar este sonho. Agradeço as alunas de IC, Mylena e a Daiana, por me auxiliarem com os incontáveis experimentos realizados durante a pesquisa.

Agradeço a Professora Silvana de Queiroz Silva e a aluna de doutorado Andressa pela disponibilidade e colaboração com as análises de PCR. Aos colegas de laboratórios parceiros: Raquel, Mari, Natália, Fábio, Ludymyla... agradeço pela ajuda nas atividades laboratoriais diárias.

Aos meus orientadores, Robson José de Cássia Franco Afonso e Aníbal da Fonseca Santiago, sou imensamente grato pelos ensinamentos e por me guiarem ao longo desse projeto. Robson, obrigado por aceitar a ser meu orientador e também por ter confiado no meu trabalho. Aníbal, obrigado pela atenção, disponibilidade e pelas inúmeras discussões, com certeza suas contribuições foram muito enriquecedoras.

Agradeço ao SAAE/Itabirito pela disponibilidade e parceria. Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais (PPGMQ-MG). Ao Professor Jayson G. Taylor pela ajuda com a língua inglesa. A todos os professores que contribuíram para minha formação. À CAPES pelo auxílio financeiro e a UFOP pelo ensino de gratuito e de qualidade.

Viva a Universidade Pública!!!

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento”. Albert Einstein

RESUMO

O uso indiscriminado e a disposição inadequada de antibióticos são responsáveis por aumentar o processo de resistência bacteriana. Esse fato tem gerado preocupações nas comunidades científicas e governamentais em todo o mundo. Portanto, é necessário o desenvolvimento de tecnologias terciárias de tratamento de esgoto que sejam eficazes na remoção dos antibióticos. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência de remoção dos antibióticos sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP), cefalexina (CEF) e eritromicina (ERI) em efluentes secundários de uma ETE, utilizando fotobiorreatores de bancada contendo um consórcio microalgas-bactérias. Além disso, objetivou-se determinar o comportamento dos genes de resistência aos antibióticos (GRAs) *sulI*, *bla_{TEM}* e *ermB* associados aos antibióticos SMX, CEF e ERI, respectivamente. Os cultivos foram fortificados com 50 µg L⁻¹ de cada antibiótico selecionado de forma isolada, e também com 50 µg L⁻¹ da mistura formada entre SMX e TMP, pois esses antibióticos são frequentemente coadministrados. Os cultivos foram incubados em *shaker* à 150 rpm e 22 °C por sete dias. Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores iluminados com luz artificial de LED de baixa intensidade, na qual a iluminação foi feita em ciclos de forma alternada (16:8 horas, luz/escuro). O crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias foi determinado pelas análises de sólidos suspensos totais (SST) e clorofila *a*, sendo os parâmetros oxigênio dissolvido e pH monitorados diariamente. A remoção dos antibióticos foi considerada pelos seguintes mecanismos: biodegradação, bioadsorção e bioacumulação, e também pelos fatores abióticos. Os parâmetros cinéticos de remoção foram determinados por um modelo de primeira ordem. A quantificação dos antibióticos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletronebulização (HPLC-ESI-MS/MS), sendo as amostras previamente preparadas pela extração com partição em baixa temperatura (LTPE). As concentrações adicionadas dos antibióticos selecionados não inibiram o crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias. As remoções para os experimentos realizados com o consórcio cultivado no efluente real sob iluminação foram iguais a 54,34% (SMX), 18,34% (TMP), 96,54% (CEF) e 92,38% (ERI). Para os experimentos fortificados com a mistura TMP/SMX a remoção foi de 24,58% (SMX) e 48,34% (TMP). Os valores da constante cinética de remoção (*k*) variaram entre 0,018 e 1,10 d⁻¹ e os tempos de meia-vida variaram entre 0,63 e 38,72 dias. A biodegradação foi o principal mecanismo de remoção dos antibióticos, enquanto a bioadsorção e a bioacumulação foram insignificantes. A TMP foi o antibiótico mais recalcitrante dentre os analisados. A remoção dos antibióticos

selecionados em água ultrapura foi desprezível. No entanto, no efluente esterilizado a remoção foi considerável para os antibióticos SMX, TMP e ERI, possivelmente, devido à presença de fotossensibilizadores de ocorrência natural no próprio efluente secundário. As abundâncias absolutas e relativas associadas ao gene de resistência *sulI* aumentou para os cultivos fortificados com SMX e com a mistura TMP/SMX. Para os cultivos fortificados com a CEF houve uma diminuição na abundância absoluta do gene *bla_{TEM}*, no entanto a abundância relativa aumentou ligeiramente. As abundâncias absolutas e relativas associadas ao gene *ermB* diminuíram significativamente, após o período de cultivo. Sendo assim, as concentrações residuais dos diferentes antibióticos estudados, presentes no meio, influenciaram na disseminação dos GRAs. O consórcio natural microalgas-bactérias utilizado no presente estudo demonstra ser uma alternativa promissora na biorremediação dos antibióticos selecionados, com potencial para remoção de outros MPEs. No entanto, estudos adicionais são necessários para compreender o papel dos principais microrganismos identificados no consórcio, bem como investigar a remoção de GRAs nos efluentes secundários.

Palavras-chave: microcontaminantes emergentes; biodegradação; antibióticos; HPLC-ESI-MS/MS; parâmetros cinéticos; genes de resistência aos antibióticos (GRAs).

ABSTRACT

The excessive consumption and inadequate disposal of antibiotics can be associated with increased bacterial resistance. This problem has been a growing concern in scientific and governmental communities worldwide. Thus, the development of tertiary technologies that are effective in removing antibiotics are needed. Therefore, the objective of this study was to assess the removal of four antibiotics: sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), cephalexin (CEP) and erythromycin (ERY) in WWTP effluent by microalgae-bacteria consortium, using photobioreactors lightened with low intensity Light Emission Diode (LED). Furthermore, this study evaluated the behavior of antibiotics resistance genes (ARGs) *sulI*, *bla_{TEM}* and *ermB* associated with SMX, CEP and ERY, respectively. The cultures were spiked with 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each selected antibiotic and also with 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ TMP/SMX mixture, due to two drugs are often co-administered. The cultures were incubated at 22°C in an incubator shaker operating at 150 rpm for 7 days. As light source, the cultures were exposed to white LED illumination (alternating light/dark periods by 16:8 h). Growth of microalgae-bacteria consortium was determined by total suspended solids (TSS) and chlorophyll *a* analysis. The pH values and DO concentrations of cultivation were monitored daily. The removal mechanisms assessed in this study included biodegradation, bioadsorption, bioaccumulation and abiotic factors. kinetics of antibiotics removal was determined using the first order model. The low-temperature partitioning extraction (LTPE) was used to prepare the samples. Subsequently, the residual concentration of antibiotics was quantified using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). Growth inhibition of microalgae-bacteria consortium by addition of 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each selected antibiotics were negligible for the experiments, when compared to the blank experiments. The experiment by active microalgae-bacteria consortium showed 54.34%, 18.34%, 96.54% and 92.38% removal at SMX, TMP, CEP and ERY concentration, respectively. The removal of TMP/SMX mixture were 24.58% (SMX) and 48.34% (TMP). The removal rate constant varied between 0.016 and 1.04 d^{-1} , whereas the half-lives varied between 0.67 and 42.26 days. The biodegradation was the main removal mechanism for the evaluated antibiotics. Bioadsorption, bioaccumulation and the antibiotics removal in ultrapure water were negligible. Nevertheless, the antibiotics removal in sterile WWTP effluent was significant for SMX, TMP and ERY. Thus, the matrix played a role in the photodegradation process, owing to the presence of naturally occurring photosensitizers in the secondary effluent. The obtained results showed that TMP was the most recalcitrant among the studied antibiotics. The behavior of ARGs indicated a proliferation of

sull, after the period of cultivation. Nevertheless, the relative abundance of *bla_{TEM}* slightly increased, although was observed a decreased in the absolute abundance. The absolute and relative abundance of *ermB* decreased after 7 days. Therefore, the natural microalgae-bacteria consortium used in this study, demonstrated to be a promising alternative for bioremediation of the selected antibiotics, with potential for removal others contaminants from wastewater effluent. Nevertheless, further studies to understand the role of the main microorganisms identified in the consortium are needed, and also the ARGs removal from secondary effluent.

Keywords: emerging contaminants; biodegradation; bioremediation; HPLC-ESI-MS/MS; antibiotic resistance genes (ARGs).

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Fórmula química estrutural do SMX.	30
Figura 3.2 - Fórmula química estrutural da TMP.	31
Figura 3.3 - Fórmula química estrutural da CEF.	32
Figura 3.4 - Fórmula química estrutural da ERI.	32
Figura 3.5 - Rota de entrada dos antibióticos de uso humano e animal no meio ambiente.	34
Figura 3.6 - Efeito simbiótico existente nos consórcios constituídos principalmente por microalgas e bactérias.	53
Figura 5.1 - Fluxograma simplificado apresentando as etapas envolvidas no estudo.	71
Figura 5.2 - LCMS-8040 utilizado nas análises de quantificação dos antibióticos de interesse.	74
Figura 5.3 - Tanque de criação de peixes, local onde foi coletado o consórcio natural microalgas-bactérias.	75
Figura 5.4 - Cultivo do inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias.	76
Figura 5.5 – Fotobiorreatores utilizados nos testes preliminares contendo a suspensão do consórcio microalgas-bactérias, fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.	77
Figura 5.6 - Fluxograma apresentando as etapas para determinação da densidade óptica do teste preliminar com SMX.	79
Figura 5.7 - Etapas necessárias para quantificar a concentração residual de cada antibiótico utilizando o cultivo do consórcio microalgas-bactérias.	82
Figura 5.8 - Vista superior do <i>shaker</i> contendo os fotobiorreatores e as respectivas identificações. O retângulo branco refere-se aos cultivos realizados sob iluminação LED.	84
Figura 5.9 - Fluxograma apresentando as etapas dos mecanismos de remoção dos antibióticos por bioadsorção e bioacumulação (modificado de Xiong <i>et al.</i> , 2016b).	86
Figura 5.10 - Fluxograma apresentando as etapas envolvidas no procedimento de preparo das amostras por LTPE.	88
Figura 6.1 - Os dez antibióticos mais consumidos no Brasil entre os anos de 2013-2016.	95
Figura 6.2 - Caracterização das microalgas presentes no consórcio microalgas-bactérias, (a) principais gêneros e (b) principais espécies.	97
Figura 6.3 - Principais gêneros de bactérias encontrados no consórcio microalgas-bactérias.	98
Figura 6.4 - Remoção da matéria orgânica dos cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.	99

Figura 6.5 - Comportamento do consórcio microalgas-bactérias, referente às variáveis (a) OD e (b) pH, para os cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.	101
Figura 6.6 - Determinação da concentração de SST para os cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.	102
Figura 6.7 - Taxa de crescimento específica (μ) do consórcio microalgas-bactérias em cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.	102
Figura 6.8 - Determinação da densidade óptica do cultivo fortificado com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.	103
Figura 6.9 - Relação entre SST e densidade óptica do cultivo fortificado com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.	104
Figura 6.10 - Avaliação do efeito do SMX no crescimento do consórcio microalgas-bactérias. (a) SST, (b) Clo <i>a</i> e (c) OD e (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.	105
Figura 6.11 - Avaliação do efeito da TMP e da mistura TMP/SMX no crescimento do consórcio microalgas-bactérias. (a) SST, (b) Clo <i>a</i> e (c) OD (batelada com a TMP), (d) OD (batelada com a mistura TMP/SMX), (e) pH (batelada com a TMP) e (f) pH (batelada com a mistura TMP/SMX). As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.	106
Figura 6.12 - Avaliação do efeito da CEF no crescimento do consórcio microalgas-bactérias durante sete dias. (a) SST, (b) Clo <i>a</i> e (c) OD (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.	107
Figura 6.13 - Avaliação do efeito da CEF no crescimento do consórcio microalgas-bactérias durante quatro dias. (a) SST, (b) Clo <i>a</i> e (c) OD (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.	108
Figura 6.14 - Avaliação do efeito da ERI no crescimento do consórcio microalgas-bactérias. (a) SST, (b) Clo <i>a</i> e (c) OD (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.	109
Figura 6.15 - Avaliação da razão Clo <i>a</i> /SST para as bateladas experimentais realizadas com (a) SMX, (b) TMP e TMP/SMX, (c) CEF e (d) ERI. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.	114
Figura 6.16 - (a) Taxa de remoção (%) do SMX, após sete dias de cultivo e (b) cinética de remoção para os cultivos fortificados com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX. Na CL e CE representam os	

cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. As siglas EL, EEL e AL representam os testes realizados no efluente, no efluente esterilizado e na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.	121
Figura 6.17 - Taxa de remoção (%) de TMP e SMX para os cultivos fortificados com 50 µg L ⁻¹ de TMP e 50 µg L ⁻¹ da mistura TMP/SMX, após sete dias de cultivo. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. As siglas EL, EEL e AL representam os testes realizados no efluente, no efluente esterilizado e na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.	122
Figura 6.18 - Cinética de remoção (%) da TMP e do SMX para os cultivos fortificados com 50 µg L ⁻¹ de TMP e 50 µg L ⁻¹ da mistura TMP/SMX. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. As siglas EL, EEL e AL representam os testes realizados no efluente, no efluente esterilizado e na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.	123
Figura 6.19 - Cinética de remoção (%) de 50 µg L ⁻¹ de CEF em água ultrapura (AL-CEF). 124	
Figura 6.20 - Cinética de remoção (%) para os cultivos fortificados com 50 µg L ⁻¹ de CEF. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. A sigla EL representa o teste realizado no efluente sob iluminação.	125
Figura 6.21 - Cinética de remoção (%) para os cultivos fortificados com 50 µg L ⁻¹ de ERI. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz, respectivamente. As siglas EL e AL representam os testes realizados no efluente na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.	126
Figura 6.22 - Abundância dos GRAs avaliados no início e após sete dias de cultivo; (a) concentrações médias dos genes <i>sull</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>ermB</i> ; e (b) abundância relativa dos genes <i>sull</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>ermB</i> em relação ao RNAr 16S.	137
Figura 6.23 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com 50µg L ⁻¹ de SMX.	142
Figura 6.24 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com 50µg L ⁻¹ de TMP. 142	
Figura 6.25 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com 50µg L ⁻¹ de CEF. 143	
Figura 6.26 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com 50µg L ⁻¹ de ERI. 143	
Figura 6.27 - Curva analítica do SMX, obtida pelo método da dupla injeção.	146

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 3.1	49
Equação 3.2	49
Equação 3.3	49
Equação 3.4	49
Equação 5.1	78
Equação 5.2	79
Equação 5.3	84
Equação 5.4	86
Equação 5.5	87
Equação 5.6	87
Equação 5.7	89
Equação 5.8	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - As principais classes de antibióticos, as estruturas químicas básicas e os principais exemplos de cada classe.	29
Tabela 3.2 - Características físico-químicas dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI.	33
Tabela 3.3 - Revisão da literatura referente à determinação de antibióticos, por HPLC-MS, em diferentes tipos de amostras, principalmente matrizes aquosas.	36
Tabela 3.4 - Remoção de antibióticos utilizando tecnologias terciárias baseadas no cultivo de microalgas.....	58
Tabela 5.1 - Características do efluente da ETE e do inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias para cada batelada experimental. Todas as análises foram realizadas em triplicata.	80
Tabela 5.2 - Acrônimos dos experimentos e controles realizados em cada batelada.....	83
Tabela 5.3 - Parâmetros e condições do espectrômetro de massas utilizadas na otimização... ..	90
Tabela 5.4 - Preparo da curva de calibração e quantificação dos antibióticos selecionados pelo método da injeção dupla.	92
Tabela 5.5 - Características dos primers <i>sull</i> , <i>ermB</i> , <i>bla_{TEM}</i> e RNAr 16s utilizados no presente estudo.....	93
Tabela 6.1 - <i>p</i> -valores para as análises de SST e Clo <i>a</i> e os valores da taxa de crescimento específica (μ) da biomassa do consórcio microalgas-bactérias.	112
Tabela 6.2 - Determinação de nutrientes (N e P) e carbono total para a batelada experimental com a CEF durante 4 dias de cultivo. Na qual CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio realizados na presença e na ausência de luz, respectivamente, (B) representam os brancos.....	118
Tabela 6.3 - Determinação de nutrientes (N e P) e carbono total para a batelada experimental com a ERI. Na qual CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio realizados na presença e na ausência de luz, respectivamente, e (B) representam os brancos.....	120
Tabela 6.4 - Balanço de massa da remoção dos antibióticos selecionados pelo consórcio microalgas-bactérias e os parâmetros cinéticos de remoção.	132
Tabela 6.5 - Ocorrência e quantificação de GRAs em diferentes tipos de tratamento, em que (-) representa a quantidade de genes removido e (+) representa o aumento na quantidade de genes após o tratamento.....	138
Tabela 6.6 - Antibióticos de interesse, razões <i>m/z</i> dos íons precursores, transições de cada antibiótico (fragmentação), otimização dos quadrupolos (Q1 e Q3) e da célula de colisão utilizando-se o equipamento LCMS-8040.....	141

Tabela 6.7 - Índice de recuperação, realizado em triplicata, para LTPE dos antibióticos estudados.	145
Tabela 6.8 - Equação da reta e os valores de R^2 para os antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI.	146
Tabela 6.9 - Curva analítica para o antibiótico SMX feita pelo método da dupla injeção.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

ACN - Acetonitrila	GRAs - Genes de resistência aos antibióticos
AMX - Amoxicilina	H ² - Deutério
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária	HPLC-MS/MS - <i>High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
ATP - Adenosina trifosfato	HRMS - <i>High resolution mass spectrometry</i>
AZI - Azitromicina	ICEB - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
BBM - <i>Bold's Basal Medium</i>	INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
BRAs - Bactérias resistentes aos antibióticos	<i>k</i> - Constante cinética de remoção
CEF - Cefalexina	K _{bio} - Constante de biodegradabilidade
CI - Carbono Inorgânico	K _d - Coeficiente de distribuição
CIP - Ciprofloxacina	K _{ow} - Coeficiente de Partição octanol/água
CLA - Claritromicina	LabMassas - Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas
Clo <i>a</i> - Clorofila <i>a</i>	LBTM - Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos
COT - Carbono Orgânico total	LD - Limite de detecção
CRF-SP - Conselho Regional de Farmácia - São Paulo	LED - <i>Light Emitting Diode</i>
CRM - <i>Certified reference material</i>	LEV - Levofloxacina
CT - Carbono total	LQM - Limite de quantificação do método
CV (%) - Coeficiente de variação	LSA - Laboratório de Saneamento Ambiental
DOU - Diário Oficial da União	LTPE - <i>Low Temperature Partitioning Extraction</i>
DQO- Demanda Química de Oxigênio	MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ECDC - <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>	MPEs - Microcontaminantes de Preocupação Emergente
EPA - <i>Environmental Protection Agency</i>	MRM - Monitoramento de reações múltiplas
ERI - Eritromicina	
ESI - <i>Electrospray Ionization</i>	
ETEs - Estação de Tratamento de Esgoto	
FBP - Filtro biológico percolador	
FM- Fase móvel	

m/z - Razão massa carga

N_d - Não detectado

N_i - Não informado

OD - Oxigênio dissolvido

OECD - *Organisation of Economic Co-operation and Development*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pK_a - Potencial de constante ácida

POAs - Processos oxidativos avançados

PPCPs - *Pharmaceutical and personal care products*

QqQ - analisador de massas triploquadrupolo

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

ROS - *Reactive oxygen species*

RSD - *Relative standard deviation*

SMX - Sulfametoxazol

SNGPC - Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados

SPE - *Solid Phase Extraction*

SPME - *Solid Phase Microextraction*

SST - Sólidos Suspensos Totais

TET - Tetraciclina

TMP - Trimetoprima

UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

UV-VIS - Ultravioleta-visível

WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	21
1.1	Organização da Tese	24
2.0	HIPÓTESES E OBJETIVOS	25
2.1	Hipóteses.....	25
2.2	Objetivos.....	25
2.2.1	Objetivo Geral	25
2.2.2	Objetivos Específicos	25
3.0	REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1	Microcontaminantes de Preocupação Emergente (MPEs).....	27
3.2	Antibióticos.....	28
3.2.1	Características dos antibióticos estudados.....	30
	<i>Sulfametoxazol (SMX)</i>	30
	<i>Trimetoprima (TMP)</i>	30
	<i>Cefalexina (CEF)</i>	31
	<i>Eritromicina (ERI)</i>	32
3.2.2	A presença de antibióticos em matrizes aquosas ambientais	34
3.2.3	Resistência bacteriana.....	41
3.2.4	Legislação.....	42
3.3	Remoção de Fármacos em Sistemas de Tratamento de Esgoto.....	43
3.3.1	Sistemas convencionais de tratamento de esgoto	43
3.3.2	Tecnologias terciárias de tratamento	44
3.3.3	Sistemas de tratamento baseados em microalgas	45
3.3.4	Crescimento e cultivo de microalgas.....	45
3.4	Tecnologias de Tratamento Baseadas na Utilização de Microalgas.....	49
3.5	Remoção de Nutrientes e MPEs Utilizando Tecnologias de Tratamento Baseadas em Microalgas	51
3.5.1	Remoção de antibióticos utilizando tecnologias de tratamento baseadas em microalgas.....	54
3.6	Preparo de Amostra	60
3.6.1	LTPE.....	61
3.7	HPLC-ESI-MS/MS	65

3.7.1	Efeito matriz	66
4.0	RELEVÂNCIA DO PROJETO	69
5.0	MATERIAS E MÉTODOS	71
5.1	Seleção dos Antibióticos para Estudo.....	72
5.2	Materiais, Reagentes e Equipamentos Utilizados.....	72
5.3	Preparo das Soluções Padrão de Antibióticos.....	74
5.4	Preparo e Cultivo do Inóculo	75
5.4.1	Identificação dos principais microrganismos presentes no inóculo	76
5.5	Testes Preliminares com SMX	77
5.5.1	Efluente sintético e a demanda química de oxigênio (DQO).....	78
5.5.2	Sólidos suspensos totais (SST) e densidade óptica	78
5.6	Coleta dos Efluentes Secundários	79
5.7	<i>Design</i> Experimental.....	81
5.8	Crescimento do Consórcio Microalgas-Bactérias nos Efluentes Secundários	84
5.9	Cromatografia de Íons e Teor de Carbono Orgânico total (COT).....	85
5.10	Mecanismos de Remoção dos Antibióticos Seleccionados	85
5.11	Avaliação da Cinética de Remoção dos Antibióticos Seleccionados pelo Consórcio Microalgas-Bactérias	87
5.12	Preparo das Amostras por LTPE	87
5.12.1	Recuperação para LTPE dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI	88
5.13	Condições Cromatográficas e de Espectrometria de Massas.....	89
5.13.1	Quantificação dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI.....	91
5.14	Quantificação dos GRAs por qPCR.....	92
5.14.1	Preparo das amostras e extração de DNA	92
5.14.2	qPCR em tempo real.....	93
5.15	Análises Estatísticas.....	94
6.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES	95
6.1	Escolha dos Antibióticos para Estudo	95
6.2	Identificação dos Principais Microrganismos Presentes no Inóculo	96
6.3	Testes Preliminares com SMX	99
6.3.1	Demanda química de oxigênio (DQO).....	99
6.3.2	Crescimento do consórcio microalgas-bactérias	99

6.4	Efeito dos Antibióticos Seleccionados no Crescimento do consórcio Microalgas-Bactérias.....	104
6.4.1	SMX	104
6.4.2	TMP e a mistura TMP/SMX	105
6.4.3	CEF.....	107
6.4.4	ERI.....	108
6.4.5	Avaliação geral do crescimento do consórcio microalgas-bactérias na presença dos antibióticos seleccionados.....	109
6.5	Determinação de Nutrientes (N e P) e Carbono Orgânico Total (COT).....	115
6.5.1	CEF (batelada experimental de 4 dias).....	116
6.5.2	ERI (batelada experimental de 7 dias)	118
6.6	Principais Mecanismos de Remoção e Cinética dos Antibióticos Estudados pelo Consórcio Microalgas-Bactérias.....	120
6.6.1	SMX	120
6.6.2	TMP e a mistura TMP/SMX	121
6.6.3	CEF.....	123
6.6.4	ERI.....	125
6.6.5	Remoção dos antibióticos estudados	126
6.7	Avaliação dos Genes de Resistência aos Antibióticos (GRAs).....	133
6.8	Condições Cromatográficas e de Espectrometria de Massas para Quantificação dos Antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI	140
6.9	Recuperação da LTPE para os Antibióticos Estudados.....	144
6.10	Quantificação dos Antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI	145
7.	CONCLUSÕES	149
	PESQUISAS FUTURAS	151
	REFERÊNCIAS	152
	APÊNDICE A – Curvas de Calibração para os Antibióticos TMP, CEF e ERI.....	165

1.0 INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma grande preocupação em relação a inserção de compostos orgânicos no meio ambiente, tais como: agrotóxicos, desreguladores endócrinos, fármacos e produtos de higiene pessoal (PPCPs - *pharmaceutical and personal care products*). Nos últimos anos, houve um aumento exponencial na produção e no uso dessas substâncias, e sua consequente disposição no meio ambiente (Zuccato *et al.*, 2010). Essas substâncias geralmente são encontradas em baixas concentrações nos ambientes aquáticos, na ordem de nanograma por litro (ng L^{-1}) a micrograma por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$), por isso são denominadas de microcontaminantes (Yoon *et al.*, 2010). A principal via de contaminação dos corpos d'água ocorre devido ao lançamento de águas residuárias *in natura* e/ou de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs) (Aquino *et al.*, 2013).

Muitos microcontaminantes, normalmente, não são monitorados no ambiente (Lagesson *et al.*, 2016), e muitos são responsáveis por causar efeitos adversos a saúde humana e aos ecossistemas, sendo por isso denominados de microcontaminantes de preocupação emergente (MPEs). A conscientização sobre os potenciais riscos dos MPEs para os seres humanos e para a biota aquática tem aumentado nos últimos anos, devido ao aumento da capacidade de detecção destas substâncias, consequência do aprimoramento das ferramentas analíticas (Sutherland e Ralph, 2019).

Dentre os MPEs, destacam-se os fármacos que foram responsáveis por revolucionar a vida moderna, sendo atualmente essenciais para manutenção da saúde dos seres humanos e animais (Wilkinson *et al.*, 2017). De acordo com a agência de proteção do meio ambiente norte-americana (EPA - *Environmental Protection Agency*) os produtos farmacêuticos são divididos em várias classes: analgésicos, reguladores lipídicos, anti-inflamatórios, hormônios sintéticos, antibióticos, entre outros (US-EPA, 2014).

Os antibióticos são medicamentos destinados a tratar doenças causadas por bactérias, agindo no tratamento de infecções em seres humanos, animais e plantas. Os antibióticos podem ser eficazes contra vários tipos de bactérias ou contra apenas um tipo específico, de acordo com a *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2018). Nesse estudo serão abordados quatro dentre os dez antibióticos mais consumidos no Brasil nos últimos anos, são eles: sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP), cefalexina (CEF) e eritromicina (ERI) (Neves e Castro *et al.*, 2020).

Os antibióticos, na maioria das vezes, são apenas parcialmente metabolizados no organismo, sendo excretados na sua forma original ou como metabólitos junto às fezes e a urina, por isso são comumente encontrados no esgoto doméstico (Watkinson *et al.*, 2007). As ETEs convencionais não foram projetadas com a finalidade de remover eficazmente os MPEs, incluindo os antibióticos (Leng *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2019b). Logo, os mesmos são frequentemente encontrados nos efluentes das ETEs (Teixeira e Granek, 2017; Xiong *et al.*, 2019a).

A presença dos antibióticos nos ambientes aquáticos pode ser responsável por aumentar o processo da resistência bacteriana (Novo *et al.*, 2013; Carvalho e Santos, 2016; Neves e Castro *et al.*, 2020). A resistência aos antibióticos tem gerado preocupações tanto na comunidade científica quanto nas entidades governamentais, pois esse fenômeno é capaz de reduzir o potencial terapêutico contra os patógenos humanos e animais. As bactérias possuem a característica de serem naturalmente resistentes a certos tipos de antibióticos (resistência intrínseca). Porém, a utilização excessiva e inapropriada de antibióticos acelera o aparecimento e a propagação de bactérias resistentes aos antibióticos (BRAs) (Krzeminski *et al.*, 2019). A problemática torna-se ainda mais alarmante quando algumas bactérias, que são usualmente susceptíveis aos antibióticos, desenvolvem resistência em decorrência de alterações genéticas (Bbosa *et al.*, 2014; ECDC, 2018). Como consequência da resistência bacteriana, tem-se um aumento na propagação de genes de resistência aos antibióticos (GRAs) (Li *et al.*, 2017; Szekeres *et al.*, 2017). A proliferação de GRAs no ambiente tem gerado preocupações globais recentes no que tange a economia e a saúde (*Organisation of Economic Co-operation and Development* (OECD, 2020)). Assim, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de tratamento terciário eficazes na remoção dos antibióticos e de outros MPEs.

As tecnologias baseadas em biorremediação utilizando microalgas mostram-se alternativas promissoras, sustentáveis e de baixo custo (Vo *et al.*, 2019). Várias pesquisas já demonstraram uma remoção significativa de macronutrientes (nitrogênio (N) e fósforo (P)) e de alguns MPEs em águas residuárias utilizando monoculturas de microalgas (Pittman *et al.*, 2011; Kligerman e Bouwer, 2015). Estudos recentes avaliaram o cultivo de algumas espécies de microalgas em matrizes aquosas simples (água desionizada, água doce e esgoto sintético) na remoção de antibióticos (Xiong *et al.*, 2016b; Bai e Acharya, 2017; Teixeira e Granek, 2017; Xiong *et al.*, 2017c; Kurade *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2019a). No entanto, a aplicação destas tecnologias utilizando apenas espécies isoladas de microalgas em sistemas

reais de tratamento de esgoto seria difícil, devido à complexidade em controlar o crescimento de outros microrganismos presentes no próprio esgoto (Silva *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019).

Os sistemas constituídos por microalgas-bactérias têm sido amplamente utilizados no tratamento de águas residuárias ricas em nutrientes (N e P) desde a década de 60 (Oswald e Gotaas, 1957). Recentemente, pesquisas estão sendo desenvolvidas com a finalidade de remover MPEs em matrizes aquosas ambientais utilizando um consórcio microalgas-bactérias, uma vez que a simbiose existente entre esses microrganismos podem favorecer a biorremediação (Eio *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2017; de la Cruz Quiroz *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019). As tecnologias terciárias que utilizam o consórcio microalgas-bactérias são alternativas promissoras no que se refere a remoção dos MPEs, pois necessitam de baixa quantidade energética para promover a oxigenação, além de favorecer a remoção de nutrientes (Quijano *et al.*, 2017). Outro fator importante é a possibilidade de obtenção de produtos derivados da biomassa algal, como por exemplo a produção de biocombustíveis e cosméticos, tornando o sistema de tratamento menos oneroso (Leng *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019).

Os principais mecanismos envolvidos na remoção dos antibióticos e de outros MPEs utilizando tecnologias baseadas em microalgas incluem a biodegradação, bioadsorção, bioacumulação e os fatores abióticos (Xiong *et al.*, 2016b; Xie *et al.*, 2020). Assim, a determinação dos mecanismos predominantes na remoção dos antibióticos precisam ser melhores compreendidos para se ter uma melhor proposição tecnológica. É importante destacar que esse tipo de sistema de tratamento não seria exclusivo para remoção de antibióticos, uma vez que o mesmo pode ser eficiente na remoção de N e P, bem como promover o decaimento de patógenos, no entanto isso não foi abordado no presente projeto.

Os efluentes secundários de uma ETE são matrizes complexas, pois contém inúmeras substâncias, inorgânicas e orgânicas, que podem interferir diretamente na determinação e quantificação dos analitos que se encontram em baixas concentrações. Portanto, as análises de antibióticos neste tipo de matriz apresentam um grande desafio para a química analítica. Sendo assim, é preciso realizar um preparo de amostra para extrair e pré-concentrar os analitos presentes, e muitas vezes é necessário realizar uma limpeza (*clean-up*) dos extratos de outros elementos da matriz. Nesta pesquisa foi utilizada a extração com partição em baixa temperatura (LTPE, *Low Temperature Partitioning Extraction*) que é um procedimento simples, eficaz e de baixo custo (Gomes *et al.*, 2017). A técnica analítica mais reportada na literatura para a determinação e quantificação de antibióticos é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. No presente estudo foi utilizada a cromatografia líquida de alta

eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (HPLC-ESI-MS/MS, *high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*).

1.1 Organização da Tese

A tese de doutoramento foi dividida em 7 capítulos. No capítulo 1 foi apresentada a introdução da pesquisa e no capítulo 2 serão abordadas as hipóteses que fundamentaram essa tese, assim como os objetivos propostos. No capítulo 3 será apresentado uma revisão abrangente da literatura, sendo abordados os seguintes temas: MPEs, principalmente os antibióticos; a presença dos antibióticos selecionados (SMX, TMP, CEF e ERI) e as concentrações comumente detectadas em matrizes aquosas ambientais; resistência aos antibióticos; legislações vigentes sobre o lançamento desses medicamentos em matrizes ambientais; sistemas convencionais de tratamento de esgoto, e a utilização de microalgas e consórcios microalgas-bactérias em tecnologias terciárias de tratamento; condições de cultivo e crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias; remoção de MPEs, com destaque para os antibióticos, utilizando tecnologias de tratamento com microalgas e com consórcios microalgas-bactérias; preparo da amostra por LTPE e a quantificação dos antibióticos em matrizes complexas por HPLC-ESI-MS/MS. Esse capítulo de revisão tem como finalidade apresentar fundamentação teórica sobre as hipóteses e os objetivos dessa tese, além de apresentar a necessidade de uma forma alternativa, sustentável, de baixo custo e eficaz na remoção de antibióticos. Após o embasamento teórico descrito, serão apresentados, no capítulo 4, as justificativas e a importância do presente projeto de pesquisa. No capítulo 5 será apresentado a metodologia geral para alcançar os objetivos propostos, sendo mostrados os procedimentos laboratoriais e as metodologias adotadas que nortearam o delineamento experimental do projeto. No capítulo 6, serão apresentados os resultados experimentais obtidos e as discussões dos mesmos. As conclusões gerais da pesquisa referente a avaliação do consórcio microalgas-bactérias e sua eficiência na remoção dos antibióticos selecionados (SMX, TMP, CEF e ERI) encontram-se no capítulo 7. Por fim, serão apresentadas as perspectivas futuras da presente pesquisa e as referências que foram utilizadas na confecção desta tese de doutoramento.

2.0 HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

- 1) A utilização de fotobiorreatores contendo um consórcio microalgas-bactérias pode ser uma tecnologia terciária promissora na remoção dos antibióticos selecionados.
- 2) A remoção dos antibióticos por sistemas de tratamento terciário usando consórcio microalgas-bactérias pode ser importante para diminuir a disseminação de BRAs e de GRAs.
- 3) A existência do efeito simbiótico entre as microalgas e as bactérias presentes no consórcio pode potencializar a biodegradação dos antibióticos selecionados. Além disso, as microalgas podem ser responsáveis pela oxigenação natural do sistema.
- 4) A extração com partição a baixa temperatura (LTPE) pode ser uma técnica eficiente na extração dos antibióticos de interesse.
- 5) A dupla injeção consecutiva pode ser uma alternativa para considerar o efeito matriz nas análises quantitativas dos antibióticos selecionados.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é investigar a remoção dos antibióticos (SMX, TMP, CEF e ERI) em efluentes secundários utilizando fotobiorreatores microalgas-bactérias. Portanto, é importante determinar os parâmetros cinéticos e os principais mecanismos envolvidos na remoção dos antibióticos em estudo. Além disso, também foi objetivo deste estudo investigar o comportamento dos genes de resistência *sulI*, *bla_{TEM}* e *ermB* associados aos antibióticos SMX, CEF e ERI, respectivamente.

2.2.2 Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo geral do estudo, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- 1) Avaliar o efeito dos antibióticos isolados SMX, TMP, CEF e ERI, e da mistura TMP e SMX sobre o crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias utilizado como tratamento terciário de esgoto doméstico;
- 2) Determinar os principais parâmetros cinéticos associados à remoção dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI pelo consórcio microalgas-bactérias, bem como investigar qual a

influência dos mecanismos de remoção dos antibióticos selecionados: biodegradação, bioadsorção, bioacumulação e fatores abióticos;

- 3) Avaliar o comportamento dos GRAs *sul1*, *bla_{TEM}* e *ermB*, quando submetidos ao tratamento terciário contendo o consórcio microalgas-bactérias, bem como estudar se esses GRAs estão associados às concentrações residuais dos antibióticos SMX, CEF e ERI, respectivamente.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microcontaminantes de Preocupação Emergente (MPEs)

Os MPEs são substâncias químicas (sintéticas ou naturais) frequentemente detectados em compartimentos ambientais. É importante destacar a importância do desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis para se conhecer as reais concentrações dos microcontaminantes no meio ambiente. A constante presença dos MPEs (fármacos, produtos de higiene pessoal, perturbadores endócrinos, entre outros) em diversas matrizes aquosas (efluentes de esgoto, águas superficiais e subterrâneas, e ocasionalmente, em água potável) tem despertado a atenção das comunidades científicas e governamentais de todo o mundo (US-EPA, 2014; Lagesson *et al.*, 2016) . Uma vez que os MPEs e os seus subprodutos são substâncias que ainda não fazem parte de programas de monitoramento de rotina, os mesmos são futuros candidatos à regulamentação, dependendo de alguns fatores, tais como: ecotoxicidade, efeitos potenciais à saúde, percepção pública e a frequência de ocorrência no meio ambiente (Wilkinson *et al.*, 2017). Os MPEs apesar de causarem efeitos prejudiciais aos seres humanos, animais e ecossistemas ainda não são monitorados com a frequência necessária (Ahmed *et al.*, 2017).

Os MPEs podem ser classificados em (*apud* Aquino *et al.*, 2013):

- i) substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas;
- ii) desreguladores endócrinos, incluindo uma gama de compostos (hormônios naturais e sintéticos, estrogênios naturais e fitoestrogênios e uma grande quantidade de substâncias sintéticas: alquilfenóis, pesticidas, herbicidas, fungicidas, ftalatos, bisfenol A, dioxinas, entre outras);
- iii) fármacos (analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos etc.) juntamente com os diversos produtos de higiene pessoal (fragrâncias, protetores solares, hidratantes, cremes etc.);
- iv) compostos aplicados na produção de resinas e plásticos.

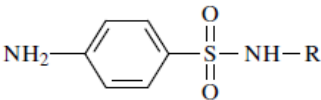
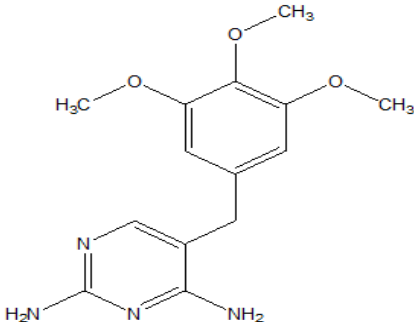
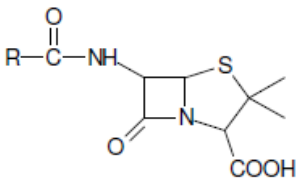
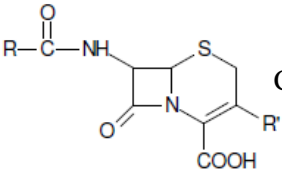
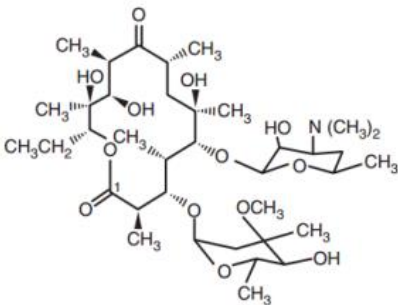
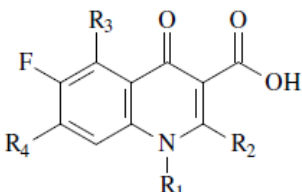
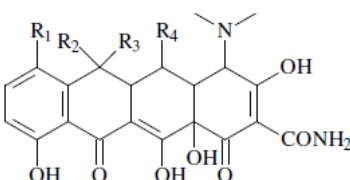
Os fármacos formam uma ampla classe de substâncias químicas que são utilizadas para diagnosticar, curar, minimizar, tratar ou mesmo prevenir doenças. Os fármacos geralmente possuem mecanismo de ação bem definido. No entanto, a exposição não intencional a esses medicamentos e suas misturas, no longo prazo, podem causar efeitos adversos, que muitas vezes ainda não são totalmente conhecidos (Zenker *et al.*, 2014; Wilkinson *et al.*, 2017). Dentre os fármacos destacam-se os antibióticos, pois a presença desses MPEs, no meio ambiente, podem ser associadas ao aumento da resistência bacteriana, fato este que é uma das grandes preocupações do século XXI (Siedlewicz *et al.*, 2016).

3.2 Antibióticos

Os antibióticos são medicamentos amplamente utilizadas na medicina humana e animal para combater doenças infecciosas (Dinh *et al.*, 2017). O termo antibiótico é utilizado por muitos pesquisadores referindo-se à compostos naturais e/ou sintéticos. Os antibióticos são responsáveis pela inibição do crescimento (efeito bacteriostático) ou mesmo por eliminar microrganismos patogênicos (efeito bactericida) (CRF-SP, 2011). A descoberta dos antibióticos foi um grande marco na medicina humana e veterinária, sendo utilizadas enormes quantidades destes medicamentos em todo o mundo (Van Boeckel *et al.*, 2014).

Os antibióticos podem ser classificados considerando seu espectro de ação, o tipo de atividade antimicrobiana e o grupo químico ao qual pertencem. Neste estudo, será descrita a classificação referente ao grupo químico, ou seja, às funções orgânicas presentes nas estruturas químicas de cada antibiótico. Dessa forma, possibilitando relacionar algumas propriedades físico-químicas dos antibióticos com a matriz ambiental utilizada na presente pesquisa. Existem mais de 15 classes de antibióticos que se diferenciam entre si, pela estrutura química e pelo modo de ação contra as bactérias (ECDC, 2018). As principais classes de antibióticos são: sulfonamidas, trimetoprimas, β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), macrolídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina (Locatelli *et al.*, 2011). As estruturas químicas básicas e os principais exemplos de cada classe são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - As principais classes de antibióticos, as estruturas químicas básicas e os principais exemplos de cada classe.

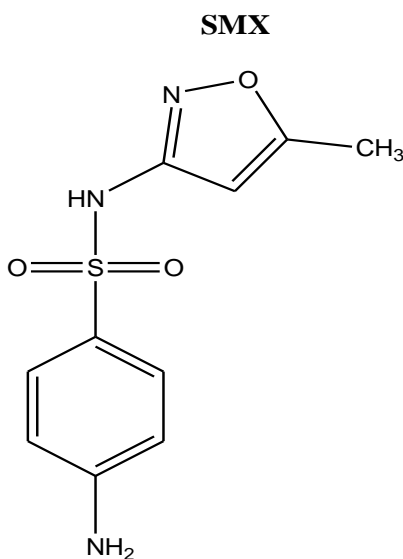
Classes	Estrutura química básica	Exemplos
Sulfonamidas		Sulfametoxazol Sulfametazina Sulfadiazina
Trimetoprimas		Trimetoprima
β - lactâmicos	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"></div> <div>Penicilina</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"></div> <div>Cefalosporina</div> </div>	Amoxicilina Ampicilina Penicilina G Cefalexina Cefuroxina
Macrolídeos		Eritromicina Claritromicina Azitromicina
Fluoroquinolonas		Norfloxacin Ciprofloxacina Levofloxacina
Tetraciclinas		Tetraciclina Clortetraciclina Doxiciclina Oxitetraciclina

3.2.1 Características dos antibióticos estudados

Sulfametoxazol (SMX)

O SMX (Figura 3.1) é o antibiótico pertencente à classe das sulfonamidas mais consumido (Wang e Wang, 2018a). As sulfonamidas eram as principais substâncias utilizadas contra infecções bacterianas antes do advento da penicilina. Apesar do aparecimento de inúmeros antibióticos, as sulfonamidas continuam sendo amplamente utilizadas (CRF-SP, 2011). O SMX é um antibiótico sintético comumente combinado com a TMP para tratar infecções do trato urinário, otite média aguda, bronquite crônica, entre outras infecções (Drugbank, 2020). As sulfonamidas são antibióticos bacteriostáticos, ativos tanto em bactérias gram-positivas quanto em bactérias gram-negativas, que agem impedindo a síntese do folato, composto essencial para replicação do DNA (Locatelli *et al.*, 2011). Aproximadamente 84,5% de SMX é excretado pela urina, sendo cerca de 30% encontrado em sua forma inalterada (Drugbank, 2020).

Figura 3.1 - Fórmula química estrutural do SMX.



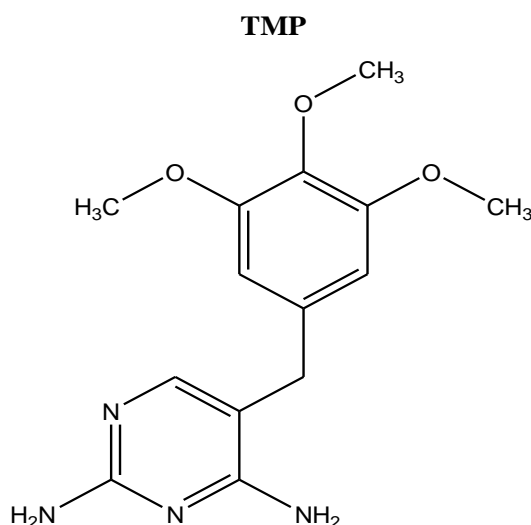
Trimetoprima (TMP)

A descoberta da TMP (Figura 3.2) propiciou a cura de muitas infecções, principalmente quando utilizada em associação ao SMX, por isso esses antibióticos normalmente são coadministrados (Teixeira e Granek, 2017). A combinação desses dois antibióticos aumenta o espectro de ação e a atividade antibacteriana (CRF-SP, 2011), no entanto a TMP pode ser usada como monoterapia no tratamento de infecções do trato urinário (Drugbank, 2020). A TMP é um antibiótico sintético que possui um efeito bacteriostático contra várias espécies de bactérias gram-negativas, atuando nas etapas da síntese do DNA, especificamente na inibição de uma

enzima responsável pela obtenção do ácido tetraidrofólico (Santos *et al.*, 2006). Aproximadamente 80% da TMP é excretada de forma inalterada na urina (Drugbank, 2020).

A mistura entre TMP e SMX possui um efeito sinérgico, sendo encontrada no medicamento comercializado com o nome de Bactrim[®] (Teixeira e Granek, 2017), que é utilizado com frequência no tratamento de infecções respiratórias, urinárias, gastrintestinais, entre outras. (Aquino *et al.*, 2013).

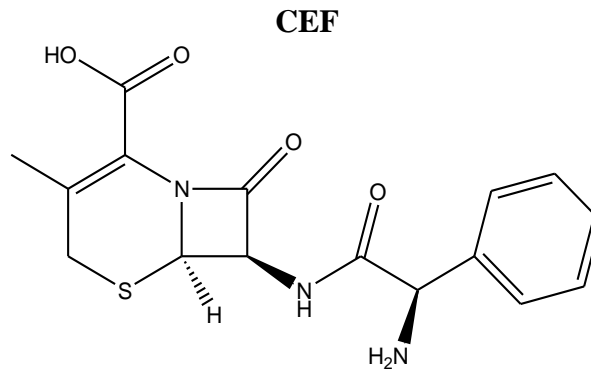
Figura 3.2 - Fórmula química estrutural da TMP.



Cefalexina (CEF)

A CEF (Figura 3.3) é uma cefalosporina pertencente a classe dos β -Lactâmicos. As cefalosporinas são antibióticos de origem natural provenientes da espécie de fungo *Cephalosporum acremonium*, esses antibióticos podem ser classificados de acordo com sua geração (1^a a 4^a) (ANVISA, 2007). A CEF possui efeito bactericida, atuando principalmente contra bactérias gram-positivas. A CEF é responsável por inibir a síntese da parede celular das bactérias, levando a morte celular. Esse antibiótico é utilizado para tratar vários tipos de infecções bacterianas, como por exemplo: trato respiratório, otite média, infecções da pele, infecções ósseas, entre outras. A CEF é excretada pela urina, em que mais de 90% permanece em sua forma inalterada (Drugbank, 2020).

Figura 3.3 - Fórmula química estrutural da CEF.



Eritromicina (ERI)

A ERI (Figura 3.4) é um antibiótico pertencente à classe dos macrolídeos juntamente com a azitromicina e a claritromicina. Os macrolídeos podem ser utilizados como fármacos alternativos em pacientes alérgicos aos antibióticos β -lactâmicos (CRF-SP, 2011). A ERI é um antibiótico de origem natural proveniente da espécie de bactéria *Streptomyces erythraeus* (Drugbank, 2020). A ERI possui efeito bacteriostático, sendo amplamente utilizada no tratamento de uma variedade de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, tais como: respiratórias, gastrointestinais, genitais, entre outras. A ERI interrompe o crescimento bacteriano pela inibição da síntese e tradução de proteínas. A ERI é excretada pela urina, em que menos de 5% permanece em sua forma inalterada (Drugbank, 2020). Na Tabela 3.2 são apresentadas algumas características físico-químicas dos quatro antibióticos selecionados no presente estudo.

Figura 3.4 - Fórmula química estrutural da ERI.

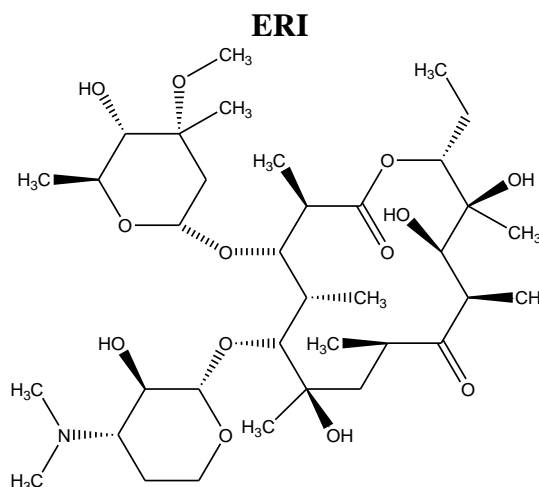


Tabela 3.2 - Características físico-químicas dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI.

Antibióticos	Classe de Antibióticos	Fórmula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	pK _a	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)
SMX	Sulfonamidas	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,2780	0,89	1,6 e 5,7	610 (37°C)
TMP	Trimetoprimas	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,3177	0,91	7,12	400 (25°C)
CEF	β - lactâmicos	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	347,389	0,65	3,5 e 7,4	10 000 (25°C)
ERI	Macrolídeos	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733.9268	2,60	8,9	2000 (25°C)

Fonte: Drugbank (2020).

O K_{ow} é uma grandeza que representa o coeficiente de partição octanol/água de uma determinada substância, usado para indicar a possibilidade de migração, particionamento, da fase aquosa para a fase orgânica. Portanto, o K_{ow} está diretamente relacionado com a lipofilicidade ou hidrofiliicidade do analito de interesse (Aquino *et al.*, 2013). Segundo esses mesmos autores, o log K_{ow} é a principal característica de um microcontaminante, podendo ser utilizada para determinar a capacidade de absorção na parte sólida de matrizes complexas, como por exemplo o esgoto. Quando os valores de log K_{ow} são menores do que 2,5 indicam alta hidrofiliicidade, valores de log K_{ow} entre 2,5 e 4,0 apresentam característica intermediária e os valores de log K_{ow} superiores a 4,0 indicam uma alta hidrofobicidade. Portanto, os antibióticos SMX, TMP e CEF possuem maior afinidade com a fase aquosa, enquanto a ERI possui uma característica intermediária, conforme pode ser observado na Tabela 3.2.

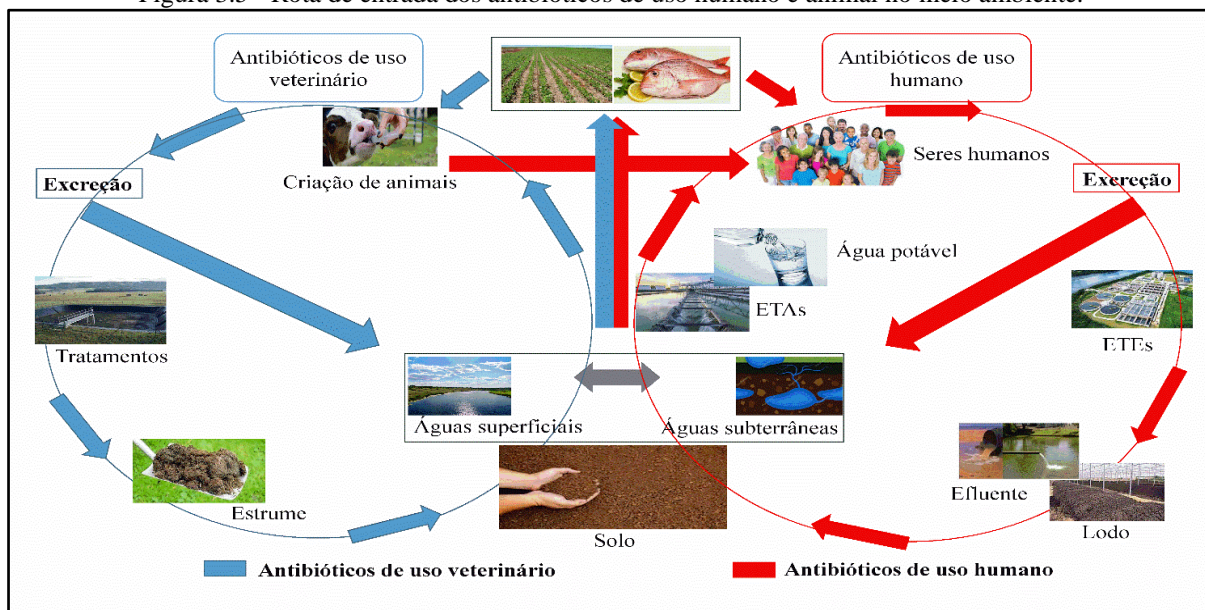
A adsorção depende do pH do meio. As moléculas básicas dos contaminantes presentes no esgoto se dissociam gerando cargas positivas, logo serão atraídas pela biomassa, que normalmente encontram-se carregadas negativamente (Aquino *et al.*, 2013). A constante de acidez (K_a) normalmente é representada pelo seu potencial (pK_a) que é o parâmetro responsável por revelar a força ácida de uma substância em meio aquoso (quanto maior o valor de pK_a mais fraco é o ácido). Os valores de pK_a para os antibióticos estudados são apresentados na Tabela 3.2. O SMX possui dois valores de pK_a (1,6 e 5,7), sendo assim quando o pH do meio estiver entre os valores do pK_a, a espécie neutra do SMX será predominante. Valores de pH do meio menores ou maiores do que o primeiro e segundo pK_a resultará na espécie predominante positiva ou negativa, respectivamente. A CEF também possui dois valores de pK_a (3,5 e 7,4),

logo pode-se considerar raciocínio análogo ao descrito para o SMX. A TMP possui um único valor de pK_a (7,12), logo se o pH do meio for menor ou maior do que o pK_a a TMP estará em sua forma predominantemente positiva ou neutra, respectivamente. A ERI possui valor de pK_a igual a 8,9, logo se o pH do meio for menor ou maior do que o pK_a predominará a espécie positiva ou neutra da ERI, respectivamente.

3.2.2 A presença de antibióticos em matrizes aquosas ambientais

O lançamento de antibióticos e de seus subprodutos no meio ambiente pode modificar ou interromper os processos vitais de diversos ecossistemas. Os efeitos ecotoxicológicos causados pelos antibióticos são difíceis de se prever, principalmente, quando se refere às matrizes aquosas complexas, como por exemplo o esgoto e os efluentes das ETEs (Carvalho e Santos, 2016). A entrada dos antibióticos em ambientes aquáticos contribui significativamente para o desenvolvimento e proliferação da resistência bacteriana (Carvalho e Santos, 2016). Na Figura 3.5, são apresentadas as possíveis vias de entrada dos antibióticos de uso humano e animal no meio ambiente (Watkinson *et al.*, 2007).

Figura 3.5 - Rota de entrada dos antibióticos de uso humano e animal no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.* (2016).

A determinação quantitativa dos antibióticos em baixas concentrações, $ng L^{-1}$ - $\mu g L^{-1}$, em matrizes aquosas ambientais tornou-se possível devido ao avanço tecnológico e ao desenvolvimento de ferramentas analíticas instrumentais apropriadas. A cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial é a técnica adequada para quantificação

de antibióticos, pois é utilizada para determinação de compostos com alta polaridade, baixa volatilidade e instáveis termicamente (Barros, 2014). Portanto, foi pesquisado sobre a determinação dos antibióticos selecionados neste estudo em diferentes matrizes ambientais (esgoto doméstico, esgoto proveniente de suinocultura e pecuária, afluente e efluente de ETEs, águas de rio, águas superficiais e macroalgas). Além disso, informações importantes referentes aos métodos cromatográficos reportados na literatura para determinações quantitativas dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI foram compiladas na Tabela 3.3. As informações apresentadas na referida tabela incluem: i) preparo de amostras utilizado; ii) equipamentos e condições de uso que incluem tipo de coluna, temperatura do forno da coluna e a fase móvel; iii) taxa de recuperação (%) dos analitos; iv) limites de detecção e de quantificação; e v) as concentrações frequentemente encontradas dos antibióticos selecionados nas mais variadas matrizes ambientais.

Tabela 3.3 - Revisão da literatura referente à determinação de antibióticos, por HPLC-MS, em diferentes tipos de amostras, principalmente matrizes aquosas.

Analito	Amostra	Preparo da amostra	Equipamento e condições de uso	Recuperação (%)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referências
TMP SMX ERI	Esgoto	Extração em fase sólida (SPE), cartuchos Oasis [®] , HLB	LC-ESI-MS/MS (triploquadrupolo), coluna C18 SunFire [™] (3,0×100 mm, 3,5 µm); FM (A) água (B) metanol, ambas com 0,015% de ácido fórmico.	122,4 105,6 87,4	6,33 0,48 2,01	21,10 1,60 6,53	319 783 Nd	(Afonso-Olivares <i>et al.</i> , 2017)
SMX	Esgoto suíno	SPE (Oasis [®] , HLB)	LC-MS (quadrupolo), coluna C18 Waters [®] (2,1×150 mm, 5,0 µm), a 30°C; FM: (A) água com 0,2% de ácido fórmico (B) Metanol e (C) ACN.	> 70	0,5 - 25,0	Ni	1,01	(Ben <i>et al.</i> , 2008)
SMX	Água de rio (Hong Kong)	SPE (Oasis [®] , HLB)	LC-ESI-MS/MS (triploquadrupolo), coluna C18 Agilent Zorbax [®] SB (15x 2,1 mm, 3,5 µm), a 40 °C. FM: (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) ACN	61 - 89	0,02 - 0,08	0,05 - 0,20	47,8	(Deng <i>et al.</i> , 2016)
CEF TMP SMX ERI	Água de Rio (França)	SPE (C18 HD [®])	LC-ESI-MS/MS (triploquadrupolo), coluna C18, Agilent Zorbax [®] Eclipse Plus (2,1×150mm, 3,5 µm), a 35°C; FM: (A) água e (B) ACN, ambas com 0,1% de ácido fórmico.	64 - 98	13,7 1,5 0,6 0,8	45,6 4,8 2,0 2,5	- - 18 4,0	(Dinh <i>et al.</i> , 2011)

Nota: LD = limite de detecção, LQ = limite de quantificação, ESI = ionização por *electrospray*, ACN = acetonitrila, Ni = não informado, Nd = não detectado, FM = fase móvel.

Tabela 3.3 - Revisão da literatura referente à determinação de antibióticos, por HPLC-MS, em diferentes tipos de amostras, principalmente matrizes aquosas (continuação).

Analito	Amostra	Preparo da amostra	Equipamento e condições de uso	Recuperação (%)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referências				
TMP	ETE	SPE (Oasis® HLB)	UHPLC-ESI-MS/MS	Ni	Ni	0,01	0,70 - 108,00	(Dong <i>et al.</i> , 2016)				
SMX						0,01	0,30 - 59,10					
ERI						0,01	Nd - 385					
CEF	Efluente doméstico	SPE (Oasis® HLB)	UHPLC-ESI-MS/MS Coluna (50×2,1 mm, 1,8µm), a 30°C; FM: (A) água com 0,1% de ácido fórmico (B) ACN.	63	1,43	4,77	Nd	(Gros <i>et al.</i> , 2013)				
SMX									60	4,78	15,94	198
TMP									84	2,75	7,84	108
SMX	Peixes	Ni	LC-ESI (triploquadropolo), coluna C18, Zorbax® Eclipse XDB (150×4,6 mm, 1,8 µm), a 35°C; FM: (A) água, (B) ACN com 0,1% de ácido fluorobutírico.	Ni	(µg kg ⁻¹) 1,30	Ni	Ni	(Gros <i>et al.</i> , 2013)				
TMP	Efluente de ETE	SPE (Oasis® HLB)	HPLC-MS/MS (triploquadropolo), coluna C18 XB XBridge™ (2,1x50 mm, 5,0 µm) FM: (A) água (B) metanol, ambas com 0,01% de ácido fórmico.	100	6	Ni	170	(Gulkowska <i>et al.</i> , 2008)				
CEF	Wan Chai								98	37	980	
ERI	(Hong Kong)								100	12	850	

Tabela 3.3 - Revisão da literatura referente à determinação de antibióticos, por HPLC-MS, em diferentes tipos de amostras, principalmente matrizes aquosas (continuação).

Analito	Amostra	Preparo da amostra	Equipamento e condições de uso	Recuperação (%)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referências
SMX ERI	Lagoa para tratamentos de suinocultura	Liofilização	LC-ESI-MS/MS Coluna (150 × 2,1 mm, 3,5 μm), a 30°C; FM: (A) água com 0,1% de ácido fórmico (B) ACN.	87,1 110	2,5 3,0	8,0 9,5	43,8 61,2	(Hu <i>et al.</i> , 2014)
SMX	Efluente de pecuária	SPE (HLB e MCX)	LC-ESI-IT-TOF, FM: (A) água com 0,3% de ácido fórmico e 0,1% de acetato de amônio (B) mistura de metanol e ACN (1:1).	73-104	25,8	Ni	Nd	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
SMX TMP	Efluente de ETE	SPE	LC-ESI-MS/MS, coluna C18 (150×2,1mm, 3,5μm); FM: (A) água e ACN (80:20 v/v) com 0,1% de acetato de amônio (B) água e ACN (20:80 v/v) com 0,1% de acetato de amônio.	Ni	0,166 0,020	0,553 0,067	<0,166 - 0,553 0,067 - 0,36	(Lacey <i>et al.</i> , 2008)
SMX TMP CEF ERI	Esgoto Municipal (Hong Kong)	SPE (Oasis® HLB)	LC-ESI-MS/MS, coluna C18 (50×2,1 mm, 1,7 μm), a 30°C; FM: (A) água, (B) ACN, ambas com 0,01% de ácido fórmico.	82,9 109,7 88,8 94,4	1,0 1,1 3,0 0,3	Ni	46,6 66,2 375,6 96,3	(Li <i>et al.</i> , 2009)

IT-TOF = ion trap - time of flight

Tabela 3.3 - Revisão da literatura referente à determinação de antibióticos, por HPLC-MS, em diferentes tipos de amostras, principalmente matrizes aquosas (continuação).

Analito (s)	Amostra	Preparo da amostra	Equipamento e condições de uso	Recuperação (%)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referências
SMX TMP ERI	Efluente de ETE	SPME (CW/TPR [®])	LC-ESI-MS/MS, coluna C18 ZORBAX [®] Eclipse XDB (4,6×250 mm, 5,0 μm). FM: (A) água, (B) ACN	87 51 61	77 15 20	260 49 66	Nd 440 160	(McClure e Wong, 2007)
SMX TMP	Efluente de ETE	SPE (Oasis [®] HLB)	LC-ESI-MS/MS, coluna C18, Polaris Ether [®] 150×2,0 mm, 3,0 μm), a 30°C; FM: (A) água (B) metanol, ambos com 0,015% de ácido fórmico).	>65	Ni	2,6 2,5	509 681	(Nödler <i>et al.</i> , 2010)
SMX TMP ERI	Efluente de ETE	SPE (Strata-X [®])	HPLC-Q-Orbitrap-HRMS, coluna C18, Kinetex [®] (100×2,1 mm, 2,6 μm), a 40°C; FM: (A) água com 0,1% de ácido fórmico (B) metanol.	104 132 92	Ni	0,05 0,01 0,10	50-120 15-43 1-5	(Pugajeva <i>et al.</i> , 2017)
TMP	Água superficial	SPE (Oasis [®] HLB)	LC-ESI-MS, coluna C18 (250 × 4,6mm, 5,0 μm) FM: (A) água (B) ACN, ambas com 0,1% de TFA.	102	1200	4000	Ni	(Rao <i>et al.</i> , 2008)

Nota: SPME = microextração em fase sólida.

Tabela 3.3 - Revisão da literatura referente à determinação de antibióticos, por HPLC-MS, em diferentes tipos de amostras, principalmente matrizes aquosas (final).

Analito (s)	Amostra	Preparo da amostra	Equipamento e condições de uso	Recuperação (%)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referências
SMX	Esgoto doméstico	SPE (Oasis [®])	Coluna Synergi HydroRP Phenomenex [®]	98	5,1	17,1	100	(Rossmann <i>et al.</i> , 2014)
TMP		HLB)	(150 × 2,0 mm, 4,0 μm), a 40 °C;	62	3,1	10,2	100	
SMX	Água de rio (França)	SPE (HLB)	LC-MS/MS, coluna C18, Hypersil Gold [®] , a 40°C; FM: (A) água com 0,1% de ácido fórmico e 0,1% de acetato de amônio (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico.	93	Ni	Ni	11,7	(Tlili <i>et al.</i> , 2016)
TMP				94			22,7	
SMX	Efluente tratado	SPE (Oasis [®])	UHPLC-ESI-MS/MS, coluna C18	76,6	0,15	0,5	290,2 - 562,0	(Tran <i>et al.</i> , 2016)
TMP			Agilent [®] Poroshell120EC (3,0x100 mm, 2,7 μm).	97,3	0,15	0,5	60,6 - 178,6	
TMP				50,3	0,15	0,5	70,2 - 186,6	
SMX	Efluente de ETE	SPE (SAX e HLB)	LC-ESI (triploquadropolo), coluna C18					(Zhou <i>et al.</i> , 2012)
TMP			Eclipse Plus [®] (100×2,1 mm, 1,8 μm), a 40°C; FM: (A) água com 0,2% de ácido fórmico e 2mM de acetato de amônio,	112	0,45	1,50	106,0	
ERI			(B) ACN.	117	0,43	1,45	64,0	
				98	1,54	5,13	695	

De acordo com os dados compilados na Tabela 3.3, a extração em cartuchos de fase sólida (SPE) foi o preparo de amostra mais utilizado para as matrizes ambientais. Assim como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi a técnica instrumental utilizada em todos os estudos para determinar e quantificar os antibióticos. A fonte de ionização (interface) por *electrospray* juntamente com os analisadores de massa quadrupolo e triploquadrupolo foram amplamente empregados. As taxas de recuperação (%) variaram entre 62,7 - 93,7% (SMX), 51,0 - 132,0% (TMP), 35,9 - 98,0% (CEF) e 61,0 - 110,0% (ERI). As concentrações encontradas variaram de 0,3 - 783,0 ng L⁻¹, 0,7 - 319,0 ng L⁻¹, 375,6 - 980,0 ng L⁻¹ e 1,0 a 850,0 ng L⁻¹ para os antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI, respectivamente. Os valores das taxas de recuperação dependem da complexidade da matriz ambiental, bem como do preparo de amostra utilizado.

3.2.3 Resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência bacteriana é um fenômeno natural, porém a utilização excessiva, inadequada juntamente com a ampla exposição a quantidades residuais de antibióticos são responsáveis por potencializar o desenvolvimento de BRAs e GRAs (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2015). A resistência aos antibióticos acontece quando os mesmos perdem a sua capacidade de matar ou inibir o crescimento das bactérias (WHO, 2014). Várias das populações de bactérias possuem a característica de se adaptar ou adquirir a resistência no meio em que vivem, permitindo então a sobrevivência e o desenvolvimento desses microrganismos em ambientes que possuem concentrações de antibióticos, que inicialmente eram capazes de detê-los (Bebell e Muiru, 2014; Carvalho e Santos, 2016).

Gross (2013) refere-se ao fenômeno da resistência bacteriana como uma ameaça apocalíptica para os seres humanos e animais. Esse autor, considera o risco de retorno a era pré-antibiótica, período em que as doenças causadas por infecções eram responsáveis por milhares de mortes. Portanto, faz-se necessário a implementação de medidas que visem avaliar o consumo e a dispensação dos antibióticos (fiscalização, regulação, supervisão e campanhas de conscientização sobre o uso), bem como alternativas tecnológicas que visem a diminuição e dispersão dos antibióticos no meio ambiente (Bebell *et al.*, 2014; WHO, 2014; Carvalho *et al.*, 2016; Leng *et al.*, 2019). Neves e Castro *et al.* (2020) avaliaram dados de dispensação dos antibióticos mais consumidos no Brasil entre os anos de 2013 e 2016. Esses dados foram fornecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e são referentes apenas à dispensação de drogarias privadas. Nesse estudo foi mostrado o aumento no consumo nacional de antibióticos quando comparados com países mais desenvolvidos. Logo em países em

desenvolvimento como o Brasil, torna-se ainda mais evidente a necessidade de medidas que objetivem mitigar o consumo exacerbado ou inadequado de antibióticos, conseqüentemente contribuindo para diminuição do processo de resistência bacteriana.

O crescente aumento da resistência aos antibióticos ocasionam danos tanto na qualidade de vida das pessoas quanto na economia, pois os tratamentos tornam-se cada vez mais dispendiosos e complexos. Portanto, a resistência bacteriana é uma questão grave, em termos de saúde pública mundial, sendo considerada como um grande problema da medicina do século atual (Gross, 2013; WHO, 2014).

Zheng *et al.* (2011) estudaram a presença de 22 antibióticos em diferentes pontos de amostragem no rio Jiulong na China. Foram encontrados antibióticos pertencentes às classes das sulfonamidas e das fluoroquinolonas. Esses mesmos autores isolaram 35 espécies de bactérias, em que foram analisadas suas resistências em relação aos 8 antibióticos detectados com maior frequência. Os resultados encontrados mostraram que a maioria das bactérias foram resistentes aos antibióticos testados.

Os GRAs avaliados neste trabalho, *sul1*, *bla_{TEM}* e *ermB*, estão associados aos antibióticos SMX, CEF e ERI, respectivamente. Logo concentrações residuais desses antibióticos podem aumentar significativamente a disseminação dos referidos genes de resistência. De acordo com Li *et al.* (2017) os genes *sul1* e *sul2* são comumente encontrados em efluentes de ETEs, uma vez que as sulfonamidas são amplamente utilizadas. Estudos recentes mostram que as concentrações de *bla_{TEM}* e *ermB* variam de 10^6 a 10^7 cópias/mL (Furlan *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2020).

3.2.4 Legislação

Conforme anteriormente mencionado, a utilização indiscriminada de antibióticos aumenta significativamente o processo de desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana, logo é de suma importância a conscientização sobre o uso racional desse tipo de medicamento. Essa é uma preocupação mundial, portanto é necessária uma discussão entre as entidades governamentais para enfrentar esse problema. O Ministério da Saúde brasileiro a pedido da OMS (Organização Mundial de Saúde) é responsável por elaborar um plano nacional visando o controle da resistência aos antibióticos. Esse plano deve ser integrado e deve contar com a participação tanto da ANVISA quanto do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (ANVISA, 2011).

Foi publicada no Diário Oficial da União (DOU), em 09 de maio de 2011, uma norma com o objetivo de regulamentar a venda de antibióticos no Brasil, a Resolução da Diretoria

Colegiada - RDC n° 20/2011, sendo a mesma atualizada em dezembro de 2014 (RDC 68/2014). O Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC) é o órgão responsável pelo controle de entrada e de saída de antibióticos no Brasil (ANVISA, 2011). É importante destacar que os antibióticos utilizados na medicina veterinária não se enquadram nessas normas, sendo necessário regulamentá-los.

Em diversos países do continente europeu, os estudos referentes à ocorrência, o destino e os efeitos dos antibióticos nos ambientes aquáticos aumentaram de forma expressiva. No entanto, a ecotoxicidade causada no meio aquático e a toxicidade causada aos seres humanos e animais necessitam de estudos aprofundados. A legislação da União Europeia para as águas de boa qualidade não englobam uma gama de MPEs, incluindo os antibióticos (Carvalho e Santos, 2016), decorrente da falta de conhecimento e compreensão sobre a toxicidade e ocorrência ambiental desses microcontaminantes.

3.3 Remoção de Fármacos em Sistemas de Tratamento de Esgoto

3.3.1 Sistemas convencionais de tratamento de esgoto

Os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal tornaram-se uma preocupação crescente devido a sua ampla distribuição, liberação contínua e efeitos adversos causados nos ecossistemas aquáticos e também na saúde dos seres humanos e animais (Bai e Acharya, 2016). Esses compostos, incluindo os antibióticos são liberados no meio ambiente, principalmente, pela excreção urinária e fecal, e também pelo descarte inadequado dos antibióticos que não são utilizados ou que apresentam o prazo de validade expirado (Melo *et al.*, 2009; Van Nuijs *et al.*, 2011; Aquino *et al.*, 2013). Os sistemas convencionais de tratamento de esgoto, principalmente brasileiro, utilizam normalmente processos biológicos de tratamento, e apenas em alguns casos específicos utilizam outras tecnologias complementares. As ETEs são projetadas com a finalidade de remover matéria orgânica, nutrientes e microrganismos patogênicos (Aquino *et al.*, 2013). Em outras palavras, as ETEs não foram projetadas com a finalidade de remover eficazmente microcontaminantes orgânicos, (Liu *et al.*, 2018), incluindo os antibióticos (Xiong *et al.*, 2016b; Leng *et al.*, 2019). Consequentemente a descarga de efluentes contendo os antibióticos são despejados diretamente nos corpos d'água (Pal *et al.*, 2010).

Van Nuijs *et al.* (2011) mostraram que baixas concentrações de antibióticos são suficientes para afetar a comunidade microbiana em ETEs, interferindo negativamente na degradação da matéria orgânica. Uma outra vertente apontada por Aquino *et al.* (2013) na compilação de dados da literatura, deixa claro a preocupação com os antibióticos, visto que

essas substâncias são responsáveis pelo desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes. Esses mesmos autores, mostram estudos que comprovaram o desenvolvimento de resistência bacteriana, em ambientes aquáticos, expostos a baixas concentrações dos antibióticos SMX, TMP, cloranfenicol e tetraciclina.

Com objetivo de compreender os principais mecanismos de remoção dos MPEs, inclusive os antibióticos, torna-se necessário o conhecimento das configurações das ETEs, dos parâmetros operacionais de cada unidade de tratamento e, também as condições ambientais juntamente com as propriedades físico-químicas de cada microcontaminante de interesse. Os mecanismos responsáveis pela remoção dos MPEs nas ETEs são descritos por Aquino *et al.* (2013), como apresentado a seguir:

- i) Sorção (absorção + adsorção): pode ser determinada pelo coeficiente de partição sólido-líquido, que também é denominado de coeficiente de distribuição (K_d). Os valores de $\log K_d$ maiores do que 2,7 indicam uma alta tendência de sorção dos microcontaminantes, valores de $\log K_d$ menores do que 2,0 demonstra uma tendência quase nula de sorção. Os valores de $\log K_d$ entre 2,0 e 2,7 indicam uma baixa tendência de sorção do microcontaminante na matriz, como por exemplo citam-se os antibióticos SMX e TMP para os sistemas que utilizam o tratamento de lodos ativados. Os valores de K_d são dependentes da molécula poluente, bem como das características do sólido, sendo assim o K_d deve ser determinado para cada tipo de matriz;
- ii) Transformações biológicas: uma das transformações mais importantes é a biodegradação que pode ser estimada pela determinação da constante de biodegradabilidade (K_{bio}).
- iii) Outros mecanismos: degradação química pelo processo de hidrólise, volatilização e fotodegradação.

3.3.2 Tecnologias terciárias de tratamento

Sistemas de tratamento terciários de esgoto estão sendo estudados com a finalidade de remover os MPEs, dentre esses sistemas destacam-se os processos oxidativos avançados (POAs). Os POAs normalmente apresentam elevada eficiência de remoção de MPEs, mas apresentam algumas desvantagens, tais como: demandam um elevado investimento, alcançam um baixo grau de mineralização da substância de interesse e em alguns casos os subprodutos formados são mais tóxicos do que as próprias substâncias precursoras (Du *et al.*, 2015). Reatores com lâmpada UV (ultravioleta) e processos envolvendo adsorção com carvão ativado também são métodos utilizados na remoção de microcontaminantes. No entanto essas tecnologias terciárias apresentam custo elevado (Aquino *et al.*, 2013).

Os sistemas de tratamento naturais denominados de *wetlands* (alagados construídos), bem como as lagoas de estabilização possuem baixo custo de construção, operação e manutenção. As *wetlands* utilizam vegetações aquáticas que podem ser usadas na remoção de alguns MPEs do esgoto (Matamoros e Bayona, 2008). Reinhold *et al.* (2010), relata que esse tipo de tecnologia depende das interações entre os processos químicos, físicos e biológicos para reduzir as concentrações dos MPEs. Porém, de acordo com Aquino *et al.* (2013), as *wetlands* possuem baixa eficiência de remoção dos antibióticos SMX e a TMP.

A biorremediação de MPEs utilizando microalgas tem sido amplamente investigada nos últimos anos, um vez que as águas residuárias, normalmente, são ambientes favoráveis para o crescimento das microalgas (Vo *et al.*, 2019). O cultivo de microalgas tem sido avaliado na remoção de alguns antibióticos, como por exemplo: SMX e TMP (Teixeira e Granek, 2017), ciprofloxacina (Xiong *et al.*, 2017c), levofloxacina (Xiong *et al.*, 2016b), entre outros.

3.3.3 Microalgas

As algas constituem organismos eucarióticos que podem ser fotossintéticos ou não, sendo os mesmos uni ou pluricelulares. Algumas espécies de algas podem viver e crescer em condições adversas. A terminologia microalgas não tem valor taxonômico, sendo utilizada para referir a organismos com tamanhos que variam entre 5 e 50 μm (Mata *et al.*, 2010). As algas (verdes, vermelhas e diatomáceas) possuem organelas que são responsáveis por controlar as funções celulares (Mata *et al.*, 2010). As células das microalgas são constituídas essencialmente por lipídios, carboidratos, proteínas, ácidos graxos e uma gama de moléculas orgânicas complexas. A composição celular das microalgas é influenciada pela natureza biológica e também por fatores ambientais da região onde são encontradas (Wojciechowski *et al.*, 2013).

As microalgas eucarióticas incluem os filos: Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae, entre outros), Cryptophyta e Dinophyta (Derner *et al.*, 2006). Um fato importante é que as microalgas são responsáveis pela maior produção de oxigênio no mundo (Wojciechowski *et al.*, 2013).

3.3.4 Metabolismo e cultivo de microalgas

O crescimento das microalgas depende estritamente das condições de cultivo, podendo ser autotrófico, heterotrófico, fotoheterotrófico e mixotrófico. As algas autotróficas precisam de compostos inorgânicos como fonte de carbono (C) e de luz como fonte de energia para o

crescimento. As algas heterotróficas requerem fontes externas de compostos orgânicos como fonte de C e energia. Na fotoheterotrofia a fonte de energia é a luz e a fonte de C é orgânica. As microalgas mixotróficas assimilam tanto o C inorgânico (CO₂) quanto o carbono orgânico como fonte de carbono e utilizam a luz ou matéria orgânica como fonte de energia (Brennan e Owende, 2010).

Park *et al.* (2012) isolaram 14 espécies de microalgas, incluindo a espécie *Chlorella sorokiniana*, sendo o crescimento das microalgas avaliado sob condições fotoautotróficas e mixotróficas em efluentes secundários de ETEs. Para o crescimento mixotrófico foi adicionado glicerol como fonte exógena de carbono orgânico no cultivo. A mixotrofia favoreceu o aumento da biomassa e de lipídeos. Dessa forma, o cultivo das microalgas em efluentes secundários de ETEs é uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis ambientalmente sustentáveis. De acordo com Park *et al.* (2012), a luz e a assimilação de nutrientes inorgânicos limitam o crescimento da biomassa produzida autotroficamente. Sendo assim, a adição de uma fonte de carbono orgânica fornece uma fonte de energia extra, aumentando a produção da biomassa microalgal.

O crescimento autotrófico das microalgas acontece pela fotossíntese, que combina água e CO₂ com luz para produção de energia e biomassa. O elemento C é essencial para o crescimento de microalgas, sendo o mesmo removido da atmosfera ou pode ser proveniente de fontes externas, na forma de CO₂, sendo posteriormente convertido em compostos orgânicos (Cai *et al.*, 2013; Kligerman e Bouwer, 2015). Dessa forma, o crescimento de microalgas em esgoto contribui significativamente para redução do lançamento de CO₂ na atmosfera e como consequência há uma diminuição da poluição ambiental. A produção de 1,0 tonelada de biomassa de microalgas requer cerca de 1,83 toneladas de CO₂ (Chisti, 2007). A fotossíntese realizada pelas microalgas é responsável por converter os nutrientes em matéria orgânica celular e como subproduto é liberado o O₂. Elementos essenciais para a atividade fotossintética incluem além do C, os elementos nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e ferro (Fe) (Wojciechowski *et al.*, 2013).

O N é um elemento importante no metabolismo das microalgas, participando da composição molecular de proteínas e enzimas. Este elemento é encontrado em moléculas orgânicas (aminoácidos, peptídeos, entre outros) e nas formas inorgânicas: amônia (NH₃), nitrato (NO₃⁻) e nitrogênio molecular (N₂). Em ambientes aquáticos o N pode ser encontrado como: N₂, íons nitrito (NO₂⁻), NO₃⁻ e íons amônio (NH₄⁺) (Wojciechowski *et al.*, 2013). As microalgas conseguem assimilar as seguintes formas de N inorgânico: N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ para produção de compostos orgânicos (Cai *et al.*, 2013). Um crescimento rápido de

algumas espécies de microalgas prefere utilizar os íons NH_4^+ ao invés de íons NO_2^- e NO_3^- como fonte de N. A diminuição parcial de N está associada às taxas de crescimento mais baixas e maior produção de lipídeos em microalgas. Os lipídeos são sintetizados como uma reserva para situações de estresse nutricional (Liu *et al.*, 2011).

As microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* foram cultivadas em meio sintético de 3 modos distintos. Para o cultivo fotoautotrófico as culturas de microalgas foram iluminadas com um fluxo luminoso de $120 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em que a iluminação foi feita em ciclos de forma alternada (16:8 horas, luz/escuro). Para os cultivos mixotróficos e heterotróficos, adicionou-se glicose (5 g L^{-1}) como fonte exógena de carbono orgânico, e os cultivos foram feitos com e sem iluminação, respectivamente (Ramsundar *et al.*, 2017). Estes mesmos autores cultivaram *Chlorella sorokiniana* mixotrófica e heterotroficamente em esgoto real, nas mesmas condições mencionadas anteriormente, por um período de 14 e 8 dias, respectivamente. O crescimento mixotrófico foi o que forneceu uma maior biomassa tanto para o efluente sintético quanto para o esgoto real. Além disso, a partir das eficiências de remoção de nutrientes, foi observado que a espécie de microalgas *Chlorella sorokiniana* assimilou preferencialmente o NH_4^+ como fonte de N, ao invés de NO_3^- , o que foi evidente pelas altas taxas de remoção de N- NH_4^+ (até 94,29%) em comparação com as eficiências de remoção de N- NO_3^- (até 28,67%) (Ramsundar *et al.*, 2017).

O elemento P é assimilado pelas microalgas, principalmente, sob a forma de íons fosfato (PO_4^{3-}) (Liu *et al.*, 2011). Estes íons são fundamentais para o metabolismo energético das microalgas, sendo responsáveis pela fosforilação, necessária para produção de ATP (adenosina trifosfato), que está relacionada com o crescimento das microalgas (Cai *et al.*, 2013). Normalmente, o esgoto doméstico possui concentrações elevadas dos elementos N e P (Kligerman e Bouwer, 2015). Logo a utilização de esgoto como meio de cultura para o crescimento da biomassa microalgal mostra ser uma alternativa promissora, principalmente, em relação a remoção e recuperação de nutrientes (N e P).

A eficiência do crescimento da biomassa microalgal no esgoto não depende apenas da concentração dos nutrientes. As atividades metabólicas das microalgas são afetadas pelas condições físico-químicas do ambiente de cultivo. Behrens (2005), considera a luz como o principal parâmetro a ser controlado no processo de crescimento da biomassa microalgal, além de outros fatores tais como: temperatura, pH, presença de CO_2 e O_2 e a presença de outros microrganismos (Pittman *et al.*, 2011). De acordo com Richmond (2008), a salinidade, agitação e as formas iônicas dos nutrientes disponíveis no meio são parâmetros que podem influenciar na eficiência do processo de crescimento da biomassa microalgal.

A intensidade da luz pode estimular o crescimento das microalgas até atingir o nível de saturação, após esse nível pode ocorrer o processo de fotoinibição (Richmond, 2008). As microalgas podem ser cultivadas utilizando energia solar para produção de matéria orgânica (Wojciechowski *et al.*, 2013). No entanto, a luz solar varia com o ciclo diário, estação do ano e latitude. Logo esses fatores limitam a produtividade da biomassa microalgal. Segundo Derner *et al.* (2006) as microalgas muitas vezes são cultivadas a céu aberto, sob condições naturais de iluminação e temperatura, o que dificulta o controle desses parâmetros. O aumento da produtividade das microalgas pode ser conseguido utilizando-se fotobiorreatores, pois consegue-se controlar as condições de cultivo, tais como: iluminação, temperatura, nutrientes, pH, entre outros parâmetros.

A iluminação artificial dos cultivos de microalgas é uma alternativa para contornar as limitações da iluminação natural. Neste contexto, os LEDs de baixa intensidade luminosa podem ser utilizados, além de possuírem as seguintes vantagens: baixo consumo energético, durabilidade e ainda não apresentam substâncias tóxicas em sua composição (Silva *et al.*, 2017). Esses mesmos autores, avaliaram a utilização de fotobiorreatores iluminados com fitas de LED no cultivo de microalgas, na qual foram obtidas eficiências de remoção de N e P iguais a 71 e 60%, respectivamente, além de 4 casas logarítmicas de *Escherichia coli*.

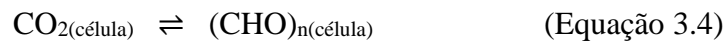
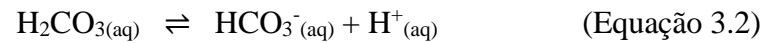
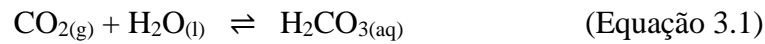
A intensidade luminosa e o espectro luminoso são características importantes da luz que interferem na atividade fotossintética realizada pelas microalgas. Comprimentos de onda (λ) na região do UV são prejudiciais ao aparelho fotossintético das microalgas, enquanto λ específicos na região do visível são fotossinteticamente ativos (Wojciechowski *et al.*, 2013).

As temperaturas mais elevadas aceleraram o metabolismo das microalgas, enquanto temperaturas mais baixas inibem o mesmo. A temperatura ótima de crescimento para muitas espécies de microalgas varia entre 15 - 26 °C (Qiang *et al.*, 1998). Temperaturas superiores à 30 °C podem inibir o crescimento das microalgas (Suali e Sarbatly, 2012). A condição climática, radiação solar e temperatura são fatores que interferem significativamente no desenvolvimento das microalgas. Portanto, em regiões de clima tropical e subtropical, que apresentam elevada incidência de radiação solar e temperaturas relativamente altas, favorecem o crescimento das microalgas (Pittman *et al.*, 2011).

O pH é um parâmetro que interfere no metabolismo das algas, pois influencia na permeabilidade da membrana, no transporte iônico e também na velocidade das reações enzimáticas (Wojciechowski *et al.*, 2013). O valor de pH do sistema microalgal está diretamente relacionado com a concentração de CO₂ no meio. O consumo de CO₂ pelas microalgas é responsável por diminuir a concentração dos íons bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻) no

sistema, e como consequência há um aumento no valor do pH, tornando o meio alcalino (Wojciechowski *et al.*, 2013). De acordo com Kumar *et al.* (2010), o aumento do pH pode inativar patógenos presentes no meio, no entanto pode haver uma inibição do crescimento microalgal.

O CO₂ é a fonte de C inorgânico mais disponível para a atividade fotossintética realizada pelas microalgas. O CO₂ dissolve-se em ambientes aquosos produzindo ácido carbônico (H₂CO₃), que é convertido nas seguintes espécies: CO_{2(aq)}, HCO_{3⁻(aq)}, CO_{3²⁻(aq)}, dependendo do valor de pH do meio. Os equilíbrios químicos envolvidos na conversão do CO₂ a H₂CO₃ na água e a fixação fotossintética do CO₂ são apresentados nas Equações 3.1-3.4 propostas por Shiraiwa (1993):



A solubilização natural do CO₂ atmosférico em meio aquoso produz H₂CO₃ (Eq. 3.1), que por sua vez é dissociado em HCO_{3⁻} e H⁺ (Eq. 3.2). A espécie HCO_{3⁻} é convertida em CO₂ e OH⁻ (Eq. 3.3), em que o CO₂ é captado ativamente pelas microalgas, sendo o mesmo reduzido na atividade fotossintética (Eq. 3.4). O OH⁻, formado na Equação 3.3, é neutralizado pelo H⁺ formado a partir da dissociação do H₂CO₃ (Eq. 3.2) à medida que mais CO₂ reage com a H₂O (Shiraiwa *et al.*, 1993). As microalgas também são capazes de assimilar carbonatos como fonte de C. Para baixos valores de pH (entre 5 e 7), o CO₂ é assimilado pela difusão, enquanto valores de pH maiores do que 7 o HCO_{3⁻} é a forma mais comum de carbono inorgânico presente em solução (Pandey *et al.*, 2013).

3.4 Tecnologias de Tratamento Baseadas na Utilização de Microalgas

O tratamento com microalgas pode ser realizado por lagoas (sistemas abertos) ou fotobiorreatores (Ozkan *et al.*, 2012). Os sistemas de tratamento que utilizam microalgas em reatores abertos normalmente apresentam baixo custo e baixa demanda energética, sendo por isso utilizados em locais com disponibilidade de energia solar. As desvantagens desses reatores incluem a demanda de área, facilidade de contaminação e um menor controle sobre as condições que afetam o cultivo das microalgas. Por outro lado, os tratamentos realizados em

fotobiorreatores não possuem essas desvantagens, porém exigem uma alta demanda energética, resultando em custo elevado, além da complexidade de aplicação em escala real (Kligerman e Bouwer, 2015).

A lagoa de estabilização de esgoto é considerada a tecnologia mais simples de tratamento, pois é utilizada em locais com clima favorável, não apresenta custo elevado de implantação e manutenção, além de ser de simples operação. Além disso, considerando as incertezas sobre as mudanças climáticas em áreas com escassez de água, a lagoa de estabilização permite o uso de esgoto tratado para suprir demandas de águas de baixa qualidade em usos menos restritos. A sequência das lagoas de estabilização (anaeróbica, facultativa e maturação) é uma alternativa economicamente favorável para remoção de patógenos e nutrientes (Von Sperling *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

O crescimento de microalgas utilizando esgoto como meio de cultivo é realizado em lagoas de alta taxa (LATs), que é um tipo de lagoa de estabilização. O O₂ proveniente da fotossíntese realizada pelas microalgas ocorre nas lagoas facultativas e de maturação, sendo responsável pela degradação da matéria orgânica na presença de bactérias aeróbias heterotróficas. Os nutrientes e o CO₂ presentes no meio são assimilados pelas microalgas, logo a coleta das mesmas garante a remoção dos nutrientes presentes no esgoto (Powell *et al.*, 2009). A produção maximizada de microalgas em LATs pode ser realizada pela adição de CO₂, pelo controle das espécies de microalgas e pelo controle de zooplânctons e parasitas (Park *et al.*, 2011).

Em sistemas de tratamento com lagoas abertas, os processos de remoção apresentam desafios devido ao pequeno tamanho das microalgas juntamente com um grande volume de líquido. A falta de métodos de remoção das microalgas do efluente final que sejam eficientes e rentáveis são as principais razões pela qual o tratamento de esgoto utilizando microalgas não sejam amplamente utilizados nas ETEs (Pittman *et al.*, 2011). Uma série de tecnologias tem sido aplicadas para coletar as microalgas, dentre elas: centrifugação, flotação, floculação, filtração, sedimentação ou uma combinação desses processos. A centrifugação é a operação mais eficiente, no entanto apresenta custos elevados devido a manutenção e a operação e demandam uma elevada quantidade de energia (Salim *et al.*, 2011). No Brasil a remoção de microalgas foi focada principalmente com o objetivo de melhorar a qualidade do esgoto tratado, garantindo a conformidade com os limites sobre as concentrações de certos compostos que podem ser prejudiciais à saúde (Von Sperling *et al.*, 2009).

3.5 Remoção de Nutrientes e MPEs Utilizando Tecnologias de Tratamento Baseadas em Microalgas

É necessário o desenvolvimento de tecnologias terciárias de tratamento de esgoto eficazes na remoção de MPEs, incluindo os antibióticos. Nesse contexto, as tecnologias de tratamento baseadas em microalgas mostram-se alternativas promissoras. O efeito de remoção dos microcontaminantes depende de diversos fatores, tais como: condições ambientais, espécies e quantidades das algas, a natureza e a estrutura química dos MPEs. Os principais mecanismos de remoção nesse tipo de tratamento incluem a bioadsorção, bioacumulação, biodegradação, fotodegradação e hidrólise (Xiong *et al.*, 2016a; Leng *et al.*, 2019).

A utilização de monoculturas de microalgas, em matrizes aquosas simples, tem sido avaliada para a remoção de nutrientes e de MPEs, incluindo os antibióticos (Bai e Acharya, 2017; Xiong *et al.*, 2019a). No entanto, em sistemas reais de tratamento de esgotos a complexidade aumenta e o uso de espécies isoladas de microalgas inviabilizaria o tratamento (Gonçalves *et al.*, 2017). Em um único habitat natural podem existir várias espécies de microalgas, na qual as mesmas podem interagir sinérgica ou antagonicamente e podem competir por nutrientes e/ou luz. Dessa forma, pesquisas que utilizam consórcios contendo microalgas na remoção de antibióticos no esgoto fornecem informações mais realistas (Xiong *et al.*, 2017b). Além disso, condições de cultura de algas axênicas raramente são mantidas na maioria dos sistemas naturais, e as bactérias aeróbicas heterotróficas estão sempre presentes, mesmo em sistemas constituídos essencialmente por algas (Fuentes *et al.*, 2016).

De acordo com Zhu *et al.* (2019), consórcios artificiais podem aumentar a abundância de espécies específicas com considerável taxa de crescimento e remoção de nutrientes. No entanto, quando a matriz é complexa, deve-se levar em consideração se essas espécies são adaptáveis nesse tipo de ambiente, que muitas vezes pode ser hostil. Além disso, microrganismos endógenos podem afetar o crescimento do consórcio artificial. A utilização de consórcios naturais microalgas-bactérias em matrizes aquosas complexas, como por exemplo os efluentes de ETEs, apresentam algumas vantagens, tais como: interações sinérgicas entre os microrganismos presentes no consórcio e o aumento da resistência às condições ambientais adversas. Esse tipo de consórcio, tem sido empregado na avaliação da remoção de nutrientes e MPEs em sistemas de tratamento de águas residuárias (Fuentes *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019).

A assimilação é o principal mecanismo de remoção de N inorgânico durante o crescimento microbiano fotoautotrófico e heterotrófico. A assimilação de formas de N oxidado, como NO_3^- ou NO_2^- começa com sua redução em íons NH_4^+ e posterior incorporação em

aminoácidos. O N reduzido (NH_4^+) pode ser diretamente assimilado pelas microalgas (Gonçalves *et al.*, 2017). Dessa forma, as microalgas utilizam preferencialmente N- NH_4^+ como fonte de N. A volatilização de NH_3 juntamente com a nitrificação e a desnitrificação também são mecanismos de remoção de N inorgânico. Em valores de $\text{pH} > 8$ pode haver volatilização de NH_3 do meio aquoso. Na nitrificação ocorre a oxidação da NH_3 a NO_3^- , enquanto na desnitrificação ocorre a redução do NO_3^- nas espécies NO_2^- , N_2 e N_2O . A nitrificação e a desnitrificação são realizadas por bactérias na presença ou na ausência de O_2 , respectivamente (Courtens *et al.*, 2016). O N orgânico proveniente de aminoácidos e proteínas, por exemplo, pode se decompor em NH_3 com a participação de enzimas específicas secretadas por uma variedade de bactérias, sendo estas reações denominadas de amonificação (Simsek *et al.*, 2016).

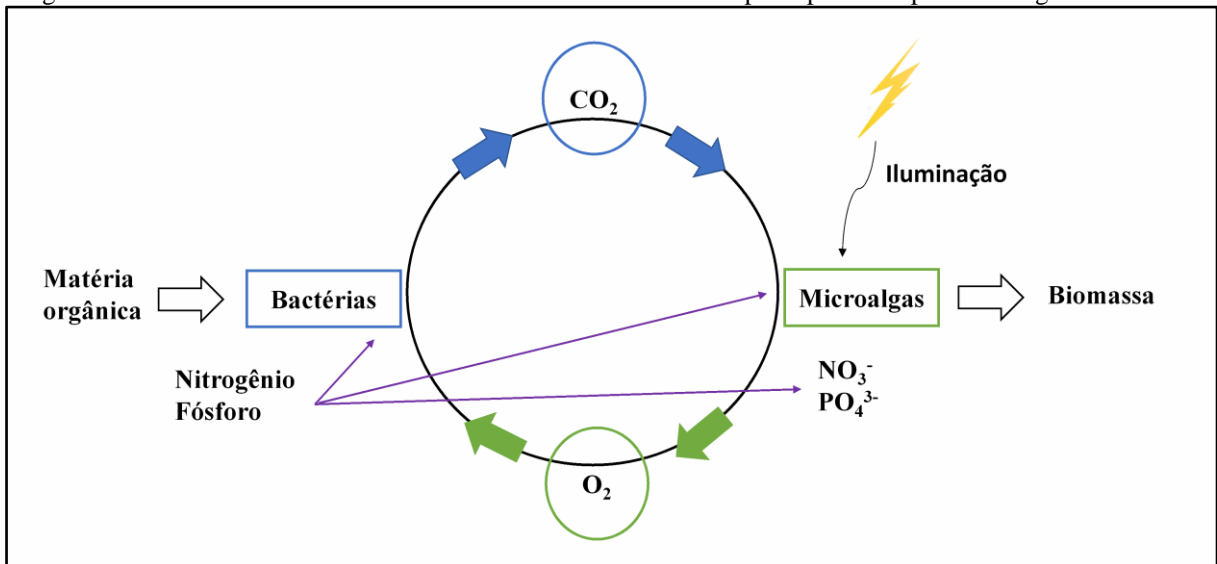
A remoção de N e P pelo consórcio microalgas-bactéria no esgoto pode ocorrer principalmente por três formas: degradação oxidativa pelas bactérias, assimilação pelas microalgas e alterações no pH do cultivo. O P é essencial para o metabolismo de microalgas e bactérias, especialmente as formas inorgânicas que podem ser incorporadas em compostos orgânicos (DNA, RNA, lipídios, etc.) através da fosforilação (Liu *et al.*, 2017). As razões entre as concentrações de carbono inorgânico (CI) e carbono orgânico total (COT) influenciam nas características dos consórcios microalgas-bactérias. Razões elevadas de CI/COT exibem uma baixa eficiência na remoção de N, e o inverso é observado para baixas razões de CI/COT (Van Den Hende *et al.*, 2011). No entanto, estes mesmos autores reportam a necessidade de avaliar as razões de CI/COT para efluentes reais.

Há uma enorme biodiversidade presente nos consórcios microalgas-bactérias e as possíveis interações inter e intraespécies existentes são complexas por natureza. Os consórcios podem apresentar comportamento sinérgico ou antagônico, variando de processo para processo. Pode haver uma cooperação, na qual é provido tanto o crescimento das microalgas quanto o crescimento das bactérias. Porém, pode existir uma competição por nutrientes e espaço (Gonçalves *et al.*, 2017; Shrivastav *et al.*, 2018). Devido as interações existentes nos consórcios microalgas-bactérias pode ser formado um ambiente estável para ambas as espécies (Liu *et al.*, 2017). No entanto, estudos ainda necessitam ser realizados com o intuito de compreender melhor como acontecem os mecanismos de degradação nos consórcios microalgas-bactérias (Wang *et al.*, 2016).

As relações bióticas cooperativas entre microalgas e bactérias desempenham funções importantes no metabolismo e crescimento microbiano, além de promover eficazmente a remoção de nutrientes. Pode haver interações simbióticas entre as microalgas e bactérias do consórcio, em que as microalgas podem sustentar o crescimento bacteriano pelo fornecimento

de C orgânico proveniente de carboidratos e proteínas. Simultaneamente o consumo de O₂ pelas bactérias aeróbias heterotróficas e a liberação de CO₂ como subproduto da respiração bacteriana favorecem o crescimento das microalgas (Eio *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2017). Na Figura 3.6 é ilustrado o efeito simbiótico que pode existir entre o consórcio formado predominantemente por microalgas e bactérias. A degradação da matéria orgânica pelas bactérias fornece nutrientes que são essenciais para o desenvolvimento das microalgas. A produção de microalgas pode ser aumentada na presença de bactérias, uma vez que as bactérias produzem a vitamina B12 como metabólito que acelera o crescimento microalgal (Fuentes *et al.*, 2016).

Figura 3.6 - Efeito simbiótico existente nos consórcios constituídos principalmente por microalgas e bactérias.



Fonte: Adaptado de Quijano *et al.* (2017).

O efeito antagônico também pode estar presente nos consórcios microalgas-bactérias, pois os metabólitos gerados pelas microalgas podem ter efeito bactericida, enquanto os metabólitos bacterianos podem ter efeito algicida (Gonçalves *et al.*, 2017). A associação das bactérias com o metabolismo microalgal ainda é responsável pelo aumento do pH e da temperatura no sistema (Wang *et al.*, 2016).

Os valores de pH do cultivo contendo o consórcio microalgas-bactérias estão diretamente relacionados com a concentração de CO₂ fornecido pelas bactérias aeróbias heterotróficas, devido ao equilíbrio estabelecido entre as seguintes espécies: CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ e CO₃²⁻ (Cai *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2017). As microalgas são responsáveis pelo aumento do pH e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) no cultivo, devido a captura do CO₂ e a liberação de O₂ pelo processo fotossintético. A remoção de antibióticos é diretamente

afetada pela mudança de pH no meio, visto que essa variável tem um efeito relevante na fisiologia dos microrganismos, na solubilidade e no estado iônico dos poluentes orgânicos (Wang e Wang, 2018a). De acordo com Wang *et al.* (2016), a utilização de consórcios microalgas-bactérias em ETEs apresentam as seguintes vantagens: redução de fontes externas de O₂, assimilação de nutrientes e redução da emissão de CO₂ devido a captação pelas microalgas.

3.5.1 Remoção de antibióticos utilizando microalgas

Recentemente, tecnologias de tratamento baseadas em microalgas estão sendo amplamente utilizadas com a finalidade de avaliar a biorremediação de antibióticos em matrizes ambientais aquosas. Os cultivos de microalgas tem sido utilizados para investigar a remoção de alguns dos antibióticos frequentemente detectados no meio ambiente, tais como: SMX (Kurade *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2019a), SMX e TMP (Bai e Acharya, 2017; Teixeira e Granek, 2017), levofloxacina (Xiong *et al.*, 2016b), ciprofloxacina (Xiong *et al.*, 2017c), amoxicilina (Liu *et al.*, 2015b), cefadrina (Du *et al.*, 2015), entre outros. De acordo com Leng *et al.* (2019), a inibição do crescimento da biomassa microalgal é um importante fator que deve ser levado em consideração no desenvolvimento de tecnologias baseadas em microalgas.

Du *et al.* (2015) investigaram a eficiência de remoção do antibiótico cefradina (150 mg L⁻¹) por *Chlorella pyrenoidosa*, em uma ETE industrial na China. Foi avaliado o tratamento com radiação ultravioleta (UV) e a combinação de ambos (microalgas - UV). Foi observado que a utilização apenas das microalgas foi um tratamento ineficaz para remoção da cefradina. A utilização apenas da radiação UV como tratamento reduziu a presença do antibiótico em 26,93%, porém aumentou a toxicidade do efluente em 1,04 vezes em relação a toxicidade inicial. Utilizando-se o tratamento microalgas - UV, no entanto, obteve-se uma remoção do antibiótico em 22,01% e a toxicidade do efluente foi reduzida quase pela metade quando comparada com o tratamento apenas utilizando radiação UV.

Xiong *et al.* (2016b) estudaram a remoção do antibiótico levofloxacina em diversas concentrações (1,0 até 300,0 mg L⁻¹), utilizando a espécie de microalgas *Chlorella vulgaris* em águas aclimatadas. Foi observado que concentrações de levofloxacina superiores a 5 mg L⁻¹ inibiram de forma considerável o crescimento das microalgas. A remoção total foi de 9,50% após 11 dias de cultivo, em que 7,53% correspondeu a biodegradação, 1,07% a bioacumulação, 0,90% a bioadsorção e a remoção por fatores abióticos foi insignificante.

A concentração dos antibióticos no meio ambiente pode ser diminuída devido aos processos bióticos (biodegradação, bioadsorção e bioacumulação) e abióticos (Xiong *et al.*,

2016b). Os fatores abióticos incluem sorção, fotodegradação e hidrólise (Guo e Chen, 2015). Caso o antibiótico seja resistente à hidrólise, tanto a fotodegradação direta como a indireta tornam-se as principais vias de degradação abiótica. A fotodegradação direta acontece quando os analitos são fotossensíveis e a fotodegradação indireta ocorre devido à presença de substâncias fotossensibilizadoras de ocorrência natural, que podem gerar espécies reativas, como os radicais hidroxila e o singlete de oxigênio (Guo e Chen, 2015).

A espécie *Scenedesmus obliquus* mostrou-se resistente a elevadas concentrações dos antibióticos SMX e sulfametazina. A remoção desses antibióticos foi de 31,4 - 62,3% (sulfametazina) e 27,7 - 46,8% (SMX) para as concentrações iniciais de 0,025 e 0,25 mg L⁻¹, depois de 12 dias de cultivo em meio de cultura esterilizado (BBM - *Bold's Basal Medium*) (Xiong *et al.*, 2019a). A toxicidade de diferentes concentrações (0, 0,05, 0,15, 0,25, 0,35 e 0,5 mg L⁻¹) de sulfametazina e de sua mistura com o SMX foram avaliadas. Concentrações ≤ 0,05 mg L⁻¹ de ambos antibióticos não inibiram significativamente o crescimento da biomassa microalgal. Contudo, aumentando a concentração houve um aumento na inibição do crescimento (73,44% na concentração de 0,5 mg L⁻¹) quando comparado ao controle (sem a presença dos antibióticos selecionados).

As remoções dos antibióticos SMX e TMP foram avaliadas utilizando a espécie de microalgas *Nannochloris sp.* em meio de cultivo F/2, em que foram adicionados 10 µg L⁻¹ dos respectivos antibióticos. Essa concentração foi utilizada com o objetivo de aproximar das concentrações comumente detectadas em efluentes de ETEs. Não houve remoção de TMP e a remoção do SMX foi de 32%, após 14 dias de cultivo (Bai e Acharya, 2016). Esses mesmos autores, avaliaram a remoção da TMP e do SMX em amostras reais de água de dois rios nos EUA. As concentrações de SMX e TMP encontradas nas amostras foram de 360 e 1,6 ng L⁻¹, respectivamente. A remoção da TMP e do SMX foram iguais a 10 e 40%, respectivamente, após 14 dias. Logo a TMP mostrou ser mais recalcitrante do que o SMX para a biorremediação utilizando a espécie de microalgas *Nannochloris sp.* (Bai e Acharya, 2017).

O crescimento da biomassa microalgal da espécie *Chlamydomonas mexicana* foi avaliado em diferentes concentrações do antibiótico ciprofloxacina (0, 2, 10, 40, 60 e 100 mg L⁻¹) no meio de cultivo BBM. As concentrações de até 10 mg L⁻¹ de ciprofloxacina não inibiram de forma significativa o crescimento das microalgas. No entanto, concentrações desse antibiótico iguais a 40, 60 e 100 mg L⁻¹ foram responsáveis por inibir o crescimento microalgal em 36, 75 e 88%, respectivamente. A remoção da ciprofloxacina 2 mg L⁻¹ foi de apenas 13%, depois de 11 dias de cultivo (Xiong *et al.*, 2017c).

A remoção do antibiótico amoxicilina nas concentrações de 200 e 500 ng L⁻¹ foi avaliada utilizando a espécie de microalgas *Microcystis aeruginosa* em meio de cultivo BG11. Foram avaliadas concentrações de N no meio de cultivo iguais a 0,05, 0,5 e 5 mg L⁻¹, em que a taxa de remoção foi de 18,5 - 19,6%, 25,2 - 26,6% e 29,6 - 30,5%, respectivamente, após 7 dias de cultivo (Liu *et al.*, 2015b).

Xiong *et al.* (2017b) avaliaram os efeitos ecotoxicológicos e a remoção do antibiótico enrofloxacina pelas seguintes espécies de microalgas: *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas mexicana*, *Chlorella vulgaris*, *Ourococcus multisporuse*, *Micractinium reisseri* e também pelo consórcio formado por essas cinco espécies. As monoculturas de microalgas e o consórcio utilizado podem suportar concentrações de até 1 mg L⁻¹ de enrofloxacina. A inibição do crescimento microalgal variou de 68 - 81% para concentração de 100 mg L⁻¹ de enrofloxacina, depois de 11 dias de cultivo, em meio de cultivo BBM. A taxa de remoção variou de 18 - 26%, em que a remoção do antibiótico pelo consórcio de microalgas foi comparável a remoção utilizando as espécies individuais.

Jaén-Gil *et al.* (2018) avaliaram a remoção e os subprodutos de nove antibióticos, incluindo a TMP e a ERI, em uma concentração final de 100 µg L⁻¹. Para isso foram utilizados fotobiorreatores com microalgas no tratamento de águas residuárias, na qual foram avaliadas quatro espécies de microalgas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella tertiolecta* e *Pseudokirchneriella subcapitata*). As espécies de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella sorokiniana* apresentaram os maiores valores de biodegradação da ERI e de outros macrolídeos. Por outro lado, a TMP mostrou-se recalcitrante ao tratamento com as microalgas selecionadas.

A remoção da TMP juntamente com outros micropoluentes (diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol, metoprolol e carbamazepina) foi investigada através de um sistema contendo a espécie de microalgas *Chlorella sorokiniana*, sendo o cultivo alimentado com águas residuárias. A biodegradação e a fotólise corresponderam a 60-100% de remoção, exceto para a carbamazepina e para a TMP que apresentaram remoções totais inferiores a 30 e 60%, respectivamente, após 31 dias. É importante ressaltar que concentrações de 100 a 300 µg L⁻¹ do *mix* de microcontaminantes não inibiram o crescimento da biomassa de *Chlorella sorokiniana* (de Wilt *et al.*, 2016).

Kiki *et al.* (2020) avaliaram a remoção de um *mix* constituído por 10 antibióticos (sulfamerazina, SMX, sulfamonometoxicina, TMP, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, moxifloxacina, levofloxacina e flumequina) nas concentrações de 20, 50 e 100 µg L⁻¹, utilizando quatro espécies de microalgas (*Haematococcus pluvialis*, *Selenastrum*

capricornutum, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella vulgaris*). O cultivo das microalgas foi realizado em esgoto sintético durante um período de 40 dias. A média de remoção dos antibióticos SMX e TMP, especificamente, foram iguais a 74 e 37%, respectivamente. O principal mecanismo de remoção foi a biodegradação e os mecanismos de bioadsorção e bioacumulação contribuíram pouco para a remoção total dos antibióticos. De acordo com Bai e Acharya (2017) a bioadsorção é um mecanismo extracelular de remoção, enquanto a bioacumulação é um mecanismo intracelular.

Xiong *et al.* (2020) avaliaram o efeito de nanopartículas de óxido de cério (CeO_2) nas concentrações de 0, 1, 50, 100 mg L^{-1} no crescimento da espécie de microalgas *Scenedesmus obliquus*, que foram cultivadas no meio de cultura BBM por 14 dias. Avaliou-se também o efeito das nanopartículas de CeO_2 na biodegradação de 0,1 mg L^{-1} de quatro antibióticos pertencentes à classe das sulfonamidas (SMX, sulmetazina, sulfadiazina e sulfadimetoxina). As nanopartículas estudadas não influenciaram no crescimento das microalgas, no entanto foram responsáveis por aumentar ligeiramente a degradação dos antibióticos selecionados. A remoção total de SMX foi 19,5% e menores do que 33,0% para as outras sulfonamidas estudadas. As nanopartículas de CeO_2 são utilizadas amplamente na fabricação de cosméticos e medicamentos, sendo também utilizadas na indústria têxtil. Portanto, essas nanopartículas são comumente encontradas em esgoto e águas superficiais. As nanopartículas de CeO_2 podem agir de forma similar as atividades de enzimas antioxidantes, que são utilizadas para eliminar as espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS). As ROS são formadas sob condições de estresse, como por exemplo a presença de antibióticos e outros MPEs, prejudicando o crescimento da biomassa microalgal (Deng *et al.*, 2017).

Ferrando *et al.* (2020) avaliaram a utilização de microalgas imobilizadas em diferentes materiais objetivando remover NO_3^- , três antibióticos (sulfacetamida, sulfametazina e SMX) e cinco pesticidas em águas subterrâneas. A matriz foi fortificada com 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (antibióticos) e 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (pesticidas), sendo também adicionado nitrato de potássio (KNO_3) e di-hidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) para atingir uma concentração inicial de NO_3^- e PO_4^{3-} igual a 200 mg L^{-1} e 0,5 mg L^{-1} , respectivamente. Esses autores, conduziram os experimentos tanto em batelada quanto em alimentação contínua. Os experimentos realizados em batelada apresentaram uma remoção média de 50% dos antibióticos e pesticidas selecionados, enquanto a remoção de NO_3^- foi igual a 48%. Os experimentos realizados com alimentação contínua apresentaram uma remoção média de microcontaminantes orgânicos igual 65% e a remoção média de NO_3^- foi igual a 81%. Os experimentos em batelada foram realizados por 10 dias e o tempo de detenção hidráulica foi igual a 8 dias para o teste realizado continuamente. Na

Tabela 3.4, são sumarizadas as espécies de microalgas e os consórcios cultivados, os antibióticos avaliados, as condições de cultivo de cada batelada experimental e as porcentagens de remoção dos antibióticos mencionados em algumas pesquisas citadas anteriormente.

Tabela 3.4 - Remoção de antibióticos utilizando tecnologias terciárias baseadas no cultivo de microalgas.

Espécies de microalgas	Antibióticos	Condições de Cultivo	Remoção total (%)	Referências
<i>Nannochloris sp.</i>	SMX TMP	1 L de meio de cultura (F/2), razão luz/escuro 12:12 h, 23 °C, por 14 dias.	32 0	(Bai e Acharya, 2016)
<i>Nannochloris sp.</i>	TMP SMX Ciprofloxacina	500 mL de água de rio esterilizada, 24 h de luz, 20 °C, por 14 dias.	10 40 100	(Bai e Acharya, 2017)
Consórcio de microalgas imobilizadas em esponjas	Sulfacetamida Sulfametazina SMX	800 mL de água subterrânea, 23 °C, intensidade luminosa de 150 $\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, razão luz/escuro de 12:12 h, 23 \pm 5 °C, por 10 dias.	15 - 87	(Ferrando e Matamoros, 2020)
<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	SMX TMP	250 mL de esgoto sintético, luz fluorescente, razão luz/escuro 12:12 h 25°C, por 40 dias	74 37	(Kiki <i>et al.</i> , 2020)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Amoxicilina	400 mL de meio (BG11), intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, razão luz/escuro 16:8 h, 25 °C, por 7 dias.	18,5 - 30,5	(Liu <i>et al.</i> , 2015b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Levofloxacina	150 mL de BBM, intensidade luminosa de 45 - 50 $\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, razão luz/escuro 16:8 h, 27 °C, 150 rpm, por 11 dias.	9,5	(Xiong <i>et al.</i> , 2016b)

Tabela 3.4 - Remoção de antibióticos utilizando tecnologias terciárias baseadas no cultivo de microalgas (final).

Espécies de microalgas	Antibióticos	Condições de Cultivo	Remoção total (%)	Referências
<i>Microalgae consortium</i>	Enrofloxacina	150 mL de BBM, intensidade luminosa de 45 - 50 $\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, razão luz/escuro 16:8 h, 27° C, 150 rpm, por 11 dias.	18 - 26	(Xiong <i>et al.</i> , 2017b)
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	Ciprofloxacina	150 mL de BBM, intensidade luminosa de 45 - 50 $\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, razão luz/escuro 16:8 h, 27 °C, 150 rpm, por 11 dias.	13	(Xiong <i>et al.</i> , 2017c)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	SMX sulfametazina	150 mL de BBM, intensidade luminosa de 45 - 50 $\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, razão luz/escuro 16:8 h, 27 °C, 150 rpm, por 14 dias.	46,8 62,3	(Xiong <i>et al.</i> , 2019a)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	SMX Sulfametazina Sulfadiazina Sulfadimetoxina	150 mL de BBM, intensidade luminosa de 45 - 50 $\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, razão luz/escuro 16:8 h, 27° C, 150 rpm, por 14 dias.	19,5 29,3 33,0 19,9	(Xiong <i>et al.</i> , 2020)

Conforme apresentado na Tabela 3.4 na maioria dos estudos foram utilizadas monoculturas de microalgas cultivadas em matrizes aquosas simples, objetivando avaliar a remoção de antibióticos. No entanto, em matrizes aquosas complexas, tais como o esgoto e efluentes de ETEs, seria difícil manter apenas espécies isoladas de microalgas (Silva *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019). Recentemente, existem poucos estudos na literatura que utilizam consórcios microalgas-bactérias em matrizes complexas para avaliar a remoção de nutrientes e MPEs (Eio *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2017; de la Cruz Quiroz *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019). Além disso, estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos envolvidos na remoção de antibióticos.

A utilização de consórcios microalgas-bactérias na remoção de compostos recalcitrantes ocorre, principalmente, devido à ação de bactérias. A contribuição da remoção por adsorção, volatilização, hidrólise e mineralização é relativamente pequena. É importante destacar que a relação simbiótica entre as microalgas e bactérias presentes no consórcio podem favorecer a

atividade bacteriana e também aumentar a tolerância do cultivo a exposição de antibióticos (Zhu *et al.*, 2019).

O cultivo de consórcios microalgas-bactérias apresenta-se como uma tecnologia terciária de tratamento promissora para biorremediação de microcontaminantes em águas residuárias (Liu *et al.*, 2017). Efeitos simbióticos entre microalgas e bactérias favorecem o crescimento do consórcio. A matéria orgânica é degradada pelas bactérias aeróbias heterotróficas e o CO₂ liberado na respiração desses microrganismos é utilizado no processo fotossintético realizado pelas microalgas autotróficas (Eio *et al.*, 2015). Além disso, a baixa quantidade de energia necessária para oxigenação, o aumento na remoção de nutrientes e o potencial de recuperação da biomassa tem tornado a tecnologia utilizando o consórcio microalgas-bactérias uma forma alternativa aos tratamentos tradicionais de lodo ativado (Quijano *et al.*, 2017).

López-Serna *et al.* (2019) avaliaram a remoção de dezenove medicamentos veterinários, sendo dezesseis antibióticos, em esgoto de suinocultura. Foram utilizados dois fotobiorreatores abertos em operação contínua, na qual um foi operado com um consórcio microalgas-bactérias e o outro apenas com bactérias fotossintéticas púrpuras. As maiores eficiências de remoção foram observadas para o fotobiorreator contendo o consórcio microalgas-bactérias. As remoções foram iguais a 93 e 95% para os antibióticos oxitetraciclina e doxiciclina (tetraciclina), respectivamente. A remoção de sulfadimidina (sulfonamidas) foi menor do que 70%. A taxa de remoção para os antibióticos ciprofloxacina e enrofloxacina (fluoroquinolonas) variaram entre 48 e 68%, e o restante dos medicamentos apresentaram eficiências de remoção menores do que 50%, depois de 11 dias de cultivo.

De acordo com o que foi exposto até o momento, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de tratamento terciário que sejam de baixo custo e, principalmente, eficientes na remoção de MPEs, visando melhorar a qualidade das águas. A remoção eficiente de antibióticos é muito importante, pois esses fármacos estão diretamente associados à resistência bacteriana.

3.6 Preparo de Amostra para Análise de Antibióticos em Efluentes de ETE

O preparo das amostras é sempre uma etapa crucial nas análises químicas. Para determinação de MPEs, normalmente, é necessário realizar a extração e o isolamento dos analitos, separando-os dos interferentes que também fazem parte da matriz. Em alguns casos, é preciso pré-concentrar os analitos, pois muitas vezes os mesmos encontram-se em concentrações pomenorizadas. Após realizada a etapa do preparo de amostra, é requerida uma

alíquota enriquecida com o analito, de forma que a mesma seja representativa da amostra original.

Há diversas técnicas de extração que são utilizadas no preparo de amostras ambientais aquosas, citam-se as mais empregadas: i) extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) que é o método de extração mais comumente utilizado e recomendado pelos *guidelines*; ii) microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* - SPME); iii) a extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) e iv) QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) com algumas modificações do método original. Por exemplo, Benedetti *et al.* (2020) modificaram o QuEChERS para avaliação multiresíduos de MPEs em lodos de ETEs.

Nos últimos anos, uma nova técnica de preparo de amostras tem se mostrado alternativa e promissora: a extração com partição em baixa temperatura - LTPE. O grupo de pesquisa do Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas (LabMassas) localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) - MG, é um dos pioneiros no que se refere a utilização da LTPE como preparo de amostras ambientais, juntamente com pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) - MG. A LTPE foi utilizada eficazmente em preparo de amostras aquosas. Seguem algumas aplicações de sua utilização: análise de MPEs em esgoto (Lima, 2013), análise de fármacos (Barros *et al.*, 2018) e pesticidas (Barros *et al.*, 2019) em águas superficiais, análise de metabólitos do benzeno na urina (Gomes *et al.*, 2017). Portanto, a LTPE é uma técnica aplicável para diferentes tipos de matrizes e microcontaminantes.

3.6.1 LTPE

A LTPE é uma técnica de extração que visa análises de microcontaminantes orgânicos em diferentes tipos de matrizes aquosas (Goulart *et al.*, 2010). O procedimento da LTPE pode ser descrito da seguinte forma: i) adição de uma quantidade pequena de solvente orgânico (solvente extrator) à amostra aquosa que contém o (s) analito (s), sendo formada uma mistura inicialmente miscível; ii) refrigeração da mistura formada por no mínimo 3 horas, em uma temperatura de aproximadamente -20 °C. Nessa etapa acontece a solidificação da fase aquosa e a fase orgânica continua no estado líquido, sendo agora constituída pelo solvente extrator juntamente com parte dos analitos recuperados e iii) isolamento dos analitos, para posterior análise dos mesmos por técnicas cromatográficas (Goulart *et al.*, 2010; Lima, 2013; Barros, 2014; Gomes *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2019).

A escolha da técnica adequada para a etapa do preparo de amostras está diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas dos analitos, tais como: volatilidade,

polaridade, estabilidade e as respectivas solubilidades dos analitos em meio aquoso e em solventes orgânicos (Barros, 2014). O solvente adequado a ser utilizado na LTPE deve ser capaz de extrair os analitos, bem como ser compatível com as análises cromatográficas. Exemplos de solventes orgânicos que podem ser utilizados na LTPE incluem: metanol, acetona, acetato de etila e acetonitrila (ACN) (Gomes, 2016).

O uso da ACN como solvente extrator resulta numa extração que apresenta uma menor quantidade de interferentes lipofílicos quando comparado com outros solventes e ainda permite a extração de compostos polares, com rendimentos razoáveis em matrizes aquosas (Maštovská e Lehotay, 2004). De acordo com Gomes *et al.* (2017), a utilização da ACN como solvente extrator fornece algumas vantagens na LTPE, tais como: solvente miscível em água, possui polaridade que favorece a extração de uma gama de compostos orgânicos e é um solvente compatível com técnicas cromatográficas em fase líquida e gasosa. A ACN é um solvente menos nocivo, quando comparado com outros solventes utilizados em técnicas convencionais de extração, portanto sendo uma escolha adequada do ponto de vista ambiental (Gomes, 2016).

A LTPE é uma técnica de extração que apresenta algumas vantagens quando se compara com as técnicas convencionalmente utilizadas, tais como: i) técnica de extração simples que envolve poucas etapas em seu procedimento; ii) se destaca por ser relativamente simples e de baixo custo; iii) utiliza volumes relativamente pequenos tanto do solvente orgânico extrator quanto da amostra; iv) proporciona um razoável grau de pré-concentração do analito pela evaporação do solvente extrator, por exemplo utilizando fluxo de N₂ como gás de secagem; v) técnica eficiente para a extração de compostos polares e apolares em amostras aquosas; vi) versátil, ou seja, pode ser utilizada em diferentes tipos de matrizes (Barros, 2014; Gomes *et al.*, 2017). Uma desvantagem da LTPE é que para alguns analitos torna-se necessário a realização de múltiplas extrações, o que compromete a frequência analítica das análises. A utilização específica da LTPE para extração de MPEs em amostras complexas, tais como o esgoto e efluentes de ETEs, é ainda pouco relatada na literatura (Lima, 2013). Na Tabela 3.5 são apresentados alguns estudos que utilizaram a LTPE como preparo de amostras, em diferentes tipos de matrizes aquosas, e também os principais parâmetros avaliados no procedimento da extração. Em todas as pesquisas mencionadas foi utilizada a ACN como solvente extrator.

Tabela 3.5 - Estudos que utilizaram a LTPE em diferentes tipos de amostras e os principais parâmetros que foram avaliados.

Amostras	Analitos	Tempo e T _c (°C) ^a	Variáveis	Instrumentação	Referências
Leite Materno	aflotoxinas	12h - 18°C	- tempo no ultrassom - força iônica - composição do solvente extrator	HPLC-FLD ^b (Shimadzu® LC - 20AT)	(Andrade <i>et al.</i> , 2013)
Águas superficiais	fármacos	3h - 20°C	-	UHPLC-ESI- MS/MS Shimadzu LCMS-8040	(Barros <i>et al.</i> , 2018)
Águas superficiais	pesticidas	3h - 20°C	- pH - força iônica - volume solvente orgânico	UHPLC-ESI- MS/MS Shimadzu LCMS-8040	(Barros <i>et al.</i> , 2019)
Urina	(uttMA) ^c (u-SPMA) ^d	3h - 20°C	- volume do Solvente - volume HCl 6,0 mol L ⁻¹	UHPLC-ESI- MS/MS Shimadzu LCMS-8040	(Gomes <i>et al.</i> , 2017)
Sucos de uva e leite achocolatado	carbamatos	3h - 20°C	- amostra/solvente - composição do solvente extrator - força iônica - homogeneização - tempo (partição)	HPLC-UV (Shimadzu® LC 20AT)	(Goulart <i>et al.</i> , 2012)
Esgoto doméstico	fármacos, hormônios e fenóis	3h - 20°C	- pH - força iônica - volume do solvente	GC - MS	(Lima, 2013)

Nota: ^a = Temperatura de congelamento; ^b = *fluorescence detector*; ^c = uttMA - Ácido *trans*, *trans*-mucônico urinário; ^d = u-SPMA - Ácido S-fenilmercaptúrico urinário.

Tabela 3.5 - Estudos que utilizaram a LTPE em diferentes tipos de amostras e os principais parâmetros que foram avaliados na extração (final).

Amostras	Analitos	Tempo e T_c (°C)	Variáveis	Instrumentação	Referências
Batatas e solo	paclobutrazol (fungicida)	10 min a -20°C	- tipo de solvente - T _c	UHPLC-ESI-MS/MS (Agilent® Technology)	(Liu <i>et al.</i> , 2015a)
Fígado de Porco	sulfonamidas	Nitrogênio líquido 15 seg	-	HPLC-ESI-MS/MS (Alliance® 2795)	(Lopes <i>et al.</i> , 2011)
Urina	diazepínicos	1h	- tipo de congelamento - força iônica - volume - amostra/solvente	LC-ESI-IT-TOF-MS (Shimadzu®)	(Nascentes <i>et al.</i> , 2012)
Mel	pesticidas	-	- quantidade de mel - composição do solvente -homogeneização - força iônica	GC-MS (Shimadzu® QP5050A)	(Pinho <i>et al.</i> , 2009)
Amostras de água coletadas em canais de irrigação	Agrotóxicos	1h -18°C	- fase extratora - força iônica - T _c (C°)	HPLC/UV-VIS (Varian ProStar 325 LC)	(Silvério <i>et al.</i> , 2012)

3.7 HPLC-ESI-MS/MS

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) emprega colunas cromatográficas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel (FM) que é eluída sob elevadas pressões. Essa técnica possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos, presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (Collins, 2006).

A espectrometria de massas (MS) é uma das técnicas mais importantes na análise molecular, devido ao seu potencial em fornecer informações sobre a massa molar e também informações sobre a estrutura da substância de interesse. O espectrômetro de massas é um instrumento constituído essencialmente por três partes principais: 1) fonte de ionização (interface), 2) analisador de massas e 3) detector de íons com processamento de dados. Uma vez que os íons de interesse são formados os mesmos seguem para o analisador de massas onde são analisados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) (Collins, 2006; Holler *et al.*, 2009). Na presente pesquisa a ESI (*Electrospray Ionization*) foi utilizada como fonte de ionização. Segundo Rodrigues (2012), a ESI é a fonte de ionização mais eficiente quando comparada com outras técnicas de ionização, para uma gama de compostos orgânicos em matrizes aquosas complexas.

Uma característica relevante na escolha do analisador de massas a ser utilizado é a resolução. Alguns dos analisadores de massas empregados incluem: setor magnético, quadrupolo, *Time of Flight* (TOF), *Ion Trap* (IT), *Orbitrap*, entre outros (Holler *et al.*, 2009). A utilização de analisadores de massas de estágios múltiplos, como por exemplo o triploquadrupolo (QqQ) e TOF-TOF, e a utilização de analisadores híbridos (Qq-TOF, Q-IT e IT-TOF), tornaram a espectrometria de massas sequencial uma importante técnica analítica instrumental. A espectrometria de massas sequencial permite um considerável aumento na detectabilidade e na resolução dependendo do analisador de massas utilizado, e conseqüentemente há uma diminuição na quantidade de interferentes nas análises (Holler *et al.*, 2009).

O acoplamento entre o cromatógrafo líquido e o espectrômetro de massas é considerado a técnica instrumental adequada para realizar a determinação dos MPEs, pois o cromatógrafo é responsável pela separação dos analitos, enquanto o espectrômetro de massas fornece uma análise seletiva e com baixo limite de detecção (LD) (Kanda e Glendinning, 2011). Segundo Richardson Kimura (2015), o acoplamento da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS - *High Resolution Mass Spectrometry*) com o HPLC, utilizando a ESI como fonte de

ionização, é a ferramenta analítica instrumental mais utilizada na identificação de microcontaminantes e de seus subprodutos.

3.7.1 Efeito matriz

As matrizes que possuem inúmeros interferentes além dos analitos é denominada de matriz complexa. Os efeitos de supressão ou acentuação do sinal de íons, em matrizes complexas, na espectrometria de massas são amplamente reportados na literatura, este fenômeno indesejável nas análises é denominado de efeito matriz. Normalmente, o efeito matriz não é reprodutível, comprometendo principalmente as análises quantitativas (Souverain *et al.*, 2004). Os efeitos da matriz podem ser altamente variáveis e podem ser difíceis de controlar ou prever, logo o impacto dos efeitos matriciais na exatidão, precisão e robustez dos métodos analíticos torna-se uma grande preocupação (Chambers *et al.*, 2007). Segundo Taylor (2005) o efeito matriz pode ser considerado como o “calcanhar de Aquiles” da HPLC-ESI-MS.

O efeito matriz começou a ser discutido no início dos anos 90 por Kebarle e Tang, sendo descrito a diferença de resposta do espectrômetro de massas para analitos em soluções padrão e os mesmos analitos em matrizes complexas. Alguns modelos foram propostos com o objetivo de explicar o efeito matriz. O modelo mais aceito é o resultante da competição da ionização dos analitos com componentes da matriz, provenientes da eluição da coluna cromatográfica, resultando na acentuação ou supressão de íons (Souverain *et al.*, 2004; Taylor, 2005; Chambers *et al.*, 2007). Portanto, os efeitos da matriz não devem ser desconsiderados durante o desenvolvimento de um método em HPLC-ESI-MS.

De acordo com Chambers *et al.* (2007) existem dois métodos comumente empregados para se avaliar o efeito matriz. O primeiro método, *post-column infusion*, fornece apenas informações qualitativas do efeito matriz, sendo possível identificar as possíveis regiões afetadas pelo efeito matriz. O segundo método denominado *post-extraction spike* avalia quantitativamente o efeito matriz, pois adiciona-se uma solução padrão contendo o analito na matriz e no branco, logo determina-se quantitativamente a acentuação ou supressão de íons. Outra forma de avaliar o efeito matriz é adicionando uma quantidade fixa, como padrão interno, do analito marcado, carbono 13 (C^{13}) ou deutério (H^2), nas amostras e no branco, também denominada de diluição isotópica (*isotope dilution mass spectrometry*). A função do padrão interno é corrigir o efeito matriz, porém esses padrões apresentam elevado custo e nem sempre estão disponíveis.

Uma alternativa interessante à diluição isotópica, para considerar o efeito matriz nas análises das concentrações residuais dos antibióticos, é o método da dupla injeção, empregado

anteriormente pelo grupo de pesquisa em outras matrizes ambientais e biológicas. Conforme descrito por Gomes *et al.* (2017), a metodologia consiste na injeção dupla consecutiva para o preparo da curva analítica e também para a quantificação da concentração de antibióticos nas amostras. A injeção dupla consecutiva consiste em adicionar uma quantidade fixa de solvente na primeira injeção e uma quantidade fixa de um padrão preestabelecido (*spike*) na segunda injeção. Desta forma a diferença entre as áreas do analito entre a primeira e segunda injeção é usada, como numa calibração por padrão interno, para o estabelecimento das razões para o estabelecimento da curva analítica e a determinação das concentrações dos analitos nas amostras.

4.0 RELEVÂNCIA DO PROJETO

Os sistemas de tratamentos terciários utilizados na remoção de microcontaminantes apresentam custo elevado, além de possivelmente formar subprodutos mais tóxicos do que as próprias substâncias, como observado em alguns POAs. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias terciárias alternativas, de baixo custo, eficientes na remoção dos MPEs e que gerem subprodutos com menor toxicidade que os compostos originais são necessários. Os antibióticos, especificamente, necessitam de atenção especial, pois concentrações residuais dos mesmos nos efluentes de ETEs são responsáveis por aumentar a quantidade de BRAs. Logo, a disseminação de GRAs torna-se uma preocupação emergente de saúde pública em nível mundial.

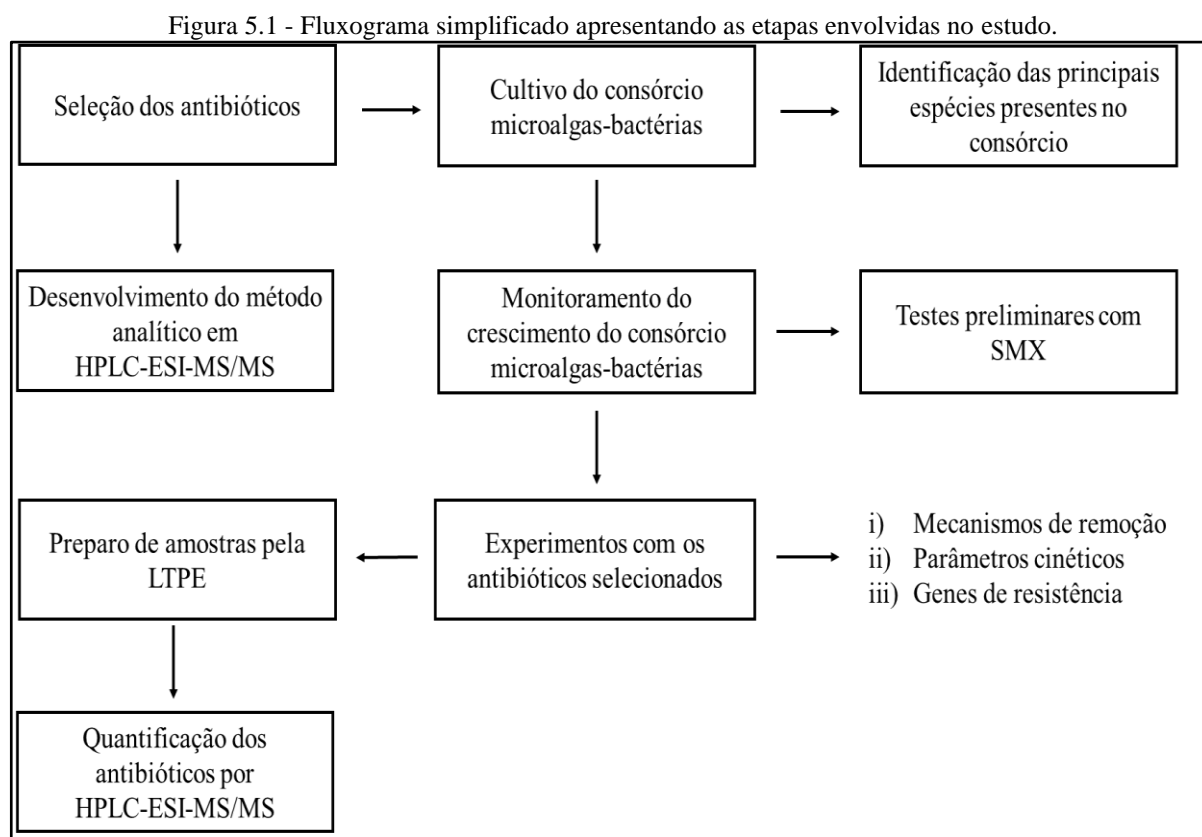
As microalgas tem sido amplamente utilizadas na remoção de macronutrientes (N e P) presentes em grandes quantidades no esgoto. Estudos atuais utilizando monoculturas de microalgas, consórcios formados por microalgas e consórcios microalgas-bactérias estão sendo realizados com o objetivo avaliar a remoção de MPEs, inclusive os antibióticos. No entanto, a maioria destas pesquisas cultivam as microalgas em matrizes aquosas simples (meio de cultivo ou esgoto artificial). Portanto, seria difícil manter espécies isoladas de microalgas em sistemas reais de tratamento de esgotos.

As pesquisas recentes avaliam a remoção de microcontaminantes em concentrações relativamente maiores do que as comumente detectadas nas matrizes aquosas ambientais. Outro fator importante é que a maioria dos estudos investigam a remoção dos microcontaminantes de maneira isolada, ou seja, sem considerar a presença de outros MPEs e de outras possíveis interferências, que normalmente são encontradas em matrizes complexas.

O presente estudo avaliou a remoção individual de quatro antibióticos (SMX, TMP, CEF e ERI), utilizando um consórcio natural microalgas-bactérias cultivados em efluente secundário. Além disso, também foi determinada a remoção da mistura entre TMP e SMX, pois esses antibióticos quando associados possuem efeito sinérgico. Os seguintes mecanismos de remoção foram investigados: biodegradação, bioadsorção, bioacumulação e fatores abióticos, sendo possível identificar os principais processos envolvidos na remoção dos antibióticos selecionados. Avaliou se o crescimento do consórcio microalgas-bactérias foi inibido pela concentração adicionada dos antibióticos estudados e também foi determinado a cinética de remoção dos mesmos. O comportamento dos GRAs foi avaliado no início e no último dia de cultivo. Sendo assim, os resultados encontrados na presente pesquisa poderão contribuir de forma efetiva para o desenvolvimento de um tratamento terciário alternativo que seja eficiente na remoção dos antibióticos selecionados.

5.0 MATERIAS E MÉTODOS

Os materiais e métodos estão organizados de forma a contemplar os objetivos propostos, conforme sumarizado no fluxograma apresentado na Figura 5.1.



Inicialmente, foi feita uma pesquisa na literatura sobre os antibióticos mais consumidos no Brasil nos últimos anos (Neves e Castro *et al.*, 2020) e posteriormente selecionou-se quatro antibióticos para estudo. Testes preliminares foram realizados com o consórcio microalgas-bactérias cultivados em esgoto sintético, em que os cultivos foram fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX. Esses testes preliminares foram feitos em fotobiorreatores iluminados com luz artificial de LED branca de baixa intensidade, à temperatura ambiente e sem agitação controlada.

Após realizar os testes preliminares com o SMX, foi utilizado efluente secundário de uma ETE local para cultivar o consórcio microalgas-bactérias. Os cultivos de cada batelada experimental foram fortificados com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ do antibiótico isolado (SMX, TMP, CEF e ERI) e também com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura, na proporção de 1:1, entre os antibióticos TMP e SMX (TMP/SMX). Os experimentos foram realizados em *shaker* com controle de agitação e temperatura. Simultaneamente, desenvolveu-se o método analítico em HPLC-ESI-MS/MS para

quantificar as concentrações residuais de cada antibiótico estudado, sendo as amostras previamente preparadas pela LTPE.

5.1 Seleção dos Antibióticos para Estudo

Foi realizada uma busca na literatura com a intenção de investigar quais seriam os antibióticos mais consumidos no Brasil nos últimos anos. Devido às poucas informações nacionais disponíveis, foi feito o contato com a ANVISA pelo “fale conosco”, sendo disponibilizado alguns dados brutos através do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). Foram obtidas informações referentes à dispensação de antibióticos, entre os anos de 2013 e 2016, provenientes apenas das farmácias e de drogarias privadas. De acordo com a RDC 22/2014, Art. 3º, Parágrafo único: “*As farmácias e as drogarias de natureza pública e os estabelecimentos de atendimento privativo de unidade hospitalar ou de qualquer outra equivalente de assistência médica não estão sujeitos a esta Resolução*”. Dessa forma, foram selecionados quatro antibióticos (SMX, TMP, CEF e ERI) dentre os 10 antibióticos mais consumidos nacionalmente entre os anos de 2013 a 2016 (Neves e Castro *et al.*, 2020). Os antibióticos selecionados pertencem a quatro classes distintas e todos são comumente detectados, na ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, nos mais diversos ambientes aquáticos.

5.2 Materiais, Reagentes e Equipamentos Utilizados

Neste tópico são apresentados os materiais, reagentes e os equipamentos utilizados nas análises envolvidas na caracterização do efluente da ETE e no cultivo do consórcio microalgas-bactérias, no preparo das amostras por LTPE e nas análises instrumentais realizadas.

1) Caracterização do efluente da ETE e análises relacionadas ao cultivo do consórcio microalgas-bactérias

- Água de torneira e água destilada;
- Balança semi-analítica;
- Inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias;
- Bomba de aquário Sarlobetter (SB1000C);
- Multiparâmetro portátil HACH HQ40d[®], com sonda de luminescência óptica para determinar oxigênio dissolvido (LDO101) e sonda para determinação de pH (pHC101);
- Tubos de ensaios com tampa rosqueada (HACH[®]) para análises da demanda Química de oxigênio (DQO);
- Espectrofotômetro (HACH DR 6000[®]) para análise de clorofila *a* (Clo *a*);

- Estufa (Excelsa 3[®], modelo 280) para análises de sólidos suspensos totais (SST);
- *Kit* do sistema para filtração a vácuo (análises de DQO, SST e Clo *a*);
- Membranas de Fibras de vidro (0,7 e 1,2 µm, GF Milipore[®]) e papéis de filtro (0,45 µm, Química Moderna[®]);
- Frascos erlenmeyers de 250 mL (utilizados como fotobiorreatores);
- Mesa com Fitas de LED de cor branca de baixa intensidade luminosa (modelo 3528-IP20, 5m);
- Vidrarias e utensílios (provetas, béqueres, espátulas, bastões de vidro e pissetas);
- *Shaker* com controle de agitação e temperatura (Tecnal, Modelo TE-424);
- Temporizador digital;
- Fotorradiômetro Delta[®] (OHM HD21012) usado para medir o fluxo luminosa das fitas de LED.

2) Preparo do esgoto sintético (OECD, 1996)

Para o preparo de 1,0 L de esgoto sintético com uma DQO de ~100 mg L⁻¹ foi utilizado água de torneira e os seguintes reagentes:

- 160,0 mg de triptona;
- 110,0 mg de extrato de carne;
- 30,0 mg de CH₄N₂O (ureia);
- 28,0 mg de KH₂PO₄ (di-hidrogenofosfato de potássio);
- 7,0 mg de NaCl (cloreto de sódio);
- 4,0 mg CaCl₂ · 2 H₂O (cloreto de cálcio di-hidratado);
- 2,0 mg MgSO₄ · 7 H₂O (sulfato de magnésio hepta-hidratado);

3) Preparo das amostras por LTPE e quantificação dos antibióticos selecionados

- Água destilada, água ultrapura, detergente Extran[®]; banho de HNO₃ 20% v/v (limpeza das vidrarias);
- Padrões dos antibióticos adquiridos da Inlab Confiança[®] (Brasil): SMX (100,2% de pureza), TMP (100,2% de pureza), CEF (98,7% de pureza). A ERI (99,9% de pureza) foi adquirida da Sigma-Aldrich[®];
- Reagentes grau-HPLC: metanol, acetonitrila e diclorometano (J. T. Backer[®]) e ácido fórmico (Merck[®], 88% de pureza);
- Ácido clorídrico (Merck[®]);

- Balança analítica (LIBROR - 45 SM[®]);
- Banho de ultrassom digital (Kondortech[®]);
- Agitador vortex (VELP Scientifica[®]);
- Frascos de vidro âmbar com tampa e batoque de teflon;
- Micropipetas de variados volumes (Thermo Scientific[®]);
- Vidrarias e utensílios (provetas, béqueres, balões volumétricos, espátulas, bastões de vidro e pissetas);
- Centrífuga;
- Centrífuga para tubos eppendorf[®];
- Vials (1,5 mL), inserts (200 e 300 µL), tubos eppendorf[®] de 2 mL (LTPE);
- Pré-coluna (4 mm x 3 mm, Phenomenex) e coluna cromatográfica: C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm, Shimpack[®] XR-ODSIII);
- HPLC-ESI-MS/MS (LCMS-8040, Shimadzu[®], Japão), apresentado na Figura 5.2.

Figura 5.2 - LCMS-8040 utilizado nas análises de quantificação dos antibióticos de interesse.



5.3 Preparo das Soluções Padrão de Antibióticos

As soluções padrão dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI foram preparadas na concentração de 1,00 g L⁻¹. Para o preparo dessas soluções, foi medido a massa de 10 mg de cada antibiótico e transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Os antibióticos SMX, TMP e ERI foram dissolvidos em metanol. A CEF foi dissolvida em água ultrapura para evitar a metanólise (Gros *et al.*, 2013). A partir das soluções padrão de cada antibiótico, foram preparadas duas soluções padrão intermediárias nas concentrações de 50,00 mg L⁻¹ (50 ppm) e

1,00 mg L⁻¹ (1 ppm). A primeira foi utilizada para fortificar os cultivos e a segunda foi utilizada para preparar as curvas analíticas. As diluições necessárias para atingir as concentrações finais desejadas foram feitas utilizando uma solução 10% metanol v/v em ACN. Todas as soluções preparadas foram armazenadas em frasco âmbar e colocadas no *freezer* a -20 °C. É importante destacar que as soluções padrão de cada antibiótico foram refeitas a cada dois meses, enquanto as soluções padrão intermediárias foram preparadas na semana de utilização.

5.4 Preparo e Cultivo do Inóculo

O consórcio microalgas-bactérias foi coletado em um ambiente natural eutrofizado (tanque de criação de peixes) no mês de janeiro de 2015. O tanque encontra-se localizado no jardim horto botânico (ICEB/UFOP), coordenadas: latitude 20°23'48" S e longitude 43°30'34" O. O local de coleta do inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias é apresentado na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Tanque de criação de peixes, local onde foi coletado o consórcio natural microalgas-bactérias.



A amostra coletada no tanque eutrofizado foi cultivada em recipiente de polietileno aberto de ~ 25 L com formato retangular (0,41 m x 0,34 m) (Figura 5.4) (Silva, 2016). O inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias foi preparado da seguinte forma: 2 L da amostra coletada foi misturada com 18 L de esgoto sintético (10,0% v/v). Para garantir a homogeneização lenta do sistema foi colocado uma bomba de aquário no sistema. A montagem do fotobiorreator foi realizada em uma sala escura, sendo o mesmo iluminado continuamente

(24 h por dia) com luz artificial de fitas de LED branca fria de baixa intensidade luminosa ($235 \pm 22 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a temperatura ambiente. As fitas de LED utilizadas neste experimento possuem comprimento de onda máximo (λ) na região de $\sim 450 \text{ nm}$. O cultivo do inóculo foi alimentado mensalmente com esgoto sintético, 10 dias antes de começar uma nova batelada experimental.

Figura 5.4 - Cultivo do inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias.



Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2017).

5.4.1 Identificação dos principais microrganismos presentes no inóculo

Alíquotas de 100 mL do inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias foram coletadas e centrifugadas por 5 min à 3500 rpm. Aproximadamente 0,5 g do *pellet* obtido foi transferido para um tubo de plástico contendo solução-tampão fosfato ($\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$). Por fim, a amostra obtida foi armazenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da extração de DNA. A identificação de microrganismos a partir do inóculo foi feita pela análise metagenômica Illumina realizada pela Neoprospecta Microbiome Technologies, conforme descrito por Christoff *et al.* (2017).

Após a extração total do DNA, as sequências da região V3-V4 do rDNA 16S (bactérias) foram amplificadas usando o *primer* específico 341F-806R. Para análises de microrganismos eucariontes (microalgas) foram usados *primers* específicos de amplificação contendo a região V9 do rDNA 18S (Kounosu *et al.*, 2019). As reações em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) foram realizadas em triplicatas usando Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, 25 ciclos de $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 seg, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 seg e $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 seg e uma extensão final de $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min. A reação final de PCR foi limpa usando esferas AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA) e as amostras foram reunidas nas bibliotecas de sequenciamento para quantificação.

As estimativas de amplificação foram realizadas com ensaios Picogreen dsDNA (Invitrogen, EUA) e, em seguida, as bibliotecas agrupadas foram diluídas para quantificação precisa de qPCR usando o KAPA Library Quantification *Kit* para plataformas Illumina (KAPA Biosystems, Woburn, MA). As sequências agrupadas foram então submetidas à classificação taxonômica comparando-as com o banco de dados RNAr 16S (NeoRefdb, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Sequências com pelo menos 99% de identidade no banco de dados de referência foram atribuídas taxonomicamente.

5.5 Testes Preliminares com SMX

O cultivo do consórcio microalgas-bactérias foi realizado em frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 200 mL de suspensão microalgas-bactérias (Figura 5.5). Foi adicionado 180 mL de esgoto sintético juntamente com 20 mL de inóculo (10% v/v do inóculo em esgoto sintético). Para obter concentrações finais 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX foram adicionados 400 μL (50,0 mg L^{-1}) e 100 μL (1,0 g L^{-1}) da solução padrão de SMX no cultivo, respectivamente. Os brancos foram feitos nas mesmas condições, porém sem a adição de SMX. A batelada experimental foi realizada, em duplicata, a temperatura ambiente por um período de 20 dias. A homogeneização da suspensão foi realizada manualmente, antes de serem medidos os valores de pH, OD e temperatura.

Figura 5.5 – Frascos erlenmeyers (250 mL de capacidade) utilizados nos testes preliminares contendo a suspensão do consórcio microalgas-bactérias, fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.



As fitas de LED utilizadas possuíam uma intensidade de fluxo luminoso igual a $235 \pm 22 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As medidas foram realizadas em 25 pontos do suporte de madeira com auxílio de um fotorradi\u00f4metro. Silva *et al.* (2017) avaliaram a efici\u00eancia de v\u00e1rias intensidades

luminosas em fotobiorreatores contendo consórcio microalgas-bactérias, na qual o melhor resultado de remoção de nutrientes (N e P) foram alcançadas utilizando luz de LED de baixa intensidade luminosa ($160 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Portanto, o valor de fluxo luminoso utilizado nesta pesquisa foi suficiente para garantir a fotoss\u00edntese realizada pelas microalgas autotr\u00f3ficas presentes no cons\u00f3rcio.

5.5.1 Efluente sint\u00e9tico e a demanda qu\u00edmica de oxig\u00eanio (DQO)

A DQO corresponde a uma oxida\u00e7\u00e3o qu\u00edmica da mat\u00e9ria org\u00e2nica, utilizando-se um oxidante forte, como por exemplo o dicromato de pot\u00e1ssio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). O esgoto sint\u00e9tico utilizado foi preparado de acordo com o procedimento proposto pela OECD (1996). Para a realiza\u00e7\u00e3o do teste preliminar o efluente sint\u00e9tico foi feito com uma concentra\u00e7\u00e3o de DQO similar a concentra\u00e7\u00e3o comumente encontrada no esgoto bruto ($\sim 1000 \text{ mg L}^{-1}$). O in\u00f3culo foi alimentado com efluente sint\u00e9tico com uma DQO de $\sim 100 \text{ mg L}^{-1}$, essa concentra\u00e7\u00e3o \u00e9 similar a encontrada normalmente no efluente de ETEs.

As an\u00e1lises de DQO foram realizadas de acordo com a metodologia proposta pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). Al\u00edquotas de 2,5 mL foram retiradas no in\u00edcio do cultivo e nos dias 8, 12, 16 e 20 para an\u00e1lise de DQO. Essas an\u00e1lises foram realizadas em triplicata, objetivando-se estimar a degrada\u00e7\u00e3o da mat\u00e9ria org\u00e2nica durante o per\u00edodo de cultivo. A efici\u00eancia de remo\u00e7\u00e3o da mat\u00e9ria org\u00e2nica (%) foi calculada pela Equa\u00e7\u00e3o 5.1:

$$E_R (\%) = \frac{\text{DQO}(t_0) - \text{DQO}(t_1)}{\text{DQO}(t_0)} \times 100 \quad (\text{Equa\u00e7\u00e3o 5.1})$$

em que, $E_R (\%)$ = efici\u00eancia de remo\u00e7\u00e3o da mat\u00e9ria org\u00e2nica, $\text{DQO}(t_0)$ = DQO no tempo inicial de cultivo e $\text{DQO}(t_1)$ = DQO no \u00faltimo dia de cultivo.

5.5.2 S\u00f3lidos suspensos totais (SST) e densidade \u00f3ptica

O crescimento da biomassa do cons\u00f3rcio microalgas-bact\u00e9rias no teste preliminar foi determinado pelas an\u00e1lises de SST e densidade \u00f3ptica. As an\u00e1lises de SST foram realizadas diariamente at\u00e9 o 8\u00b0 dia e nos dias 12, 16 e 20 de cultivo, sendo retiradas al\u00edquotas de 10 mL (APHA, 2012).

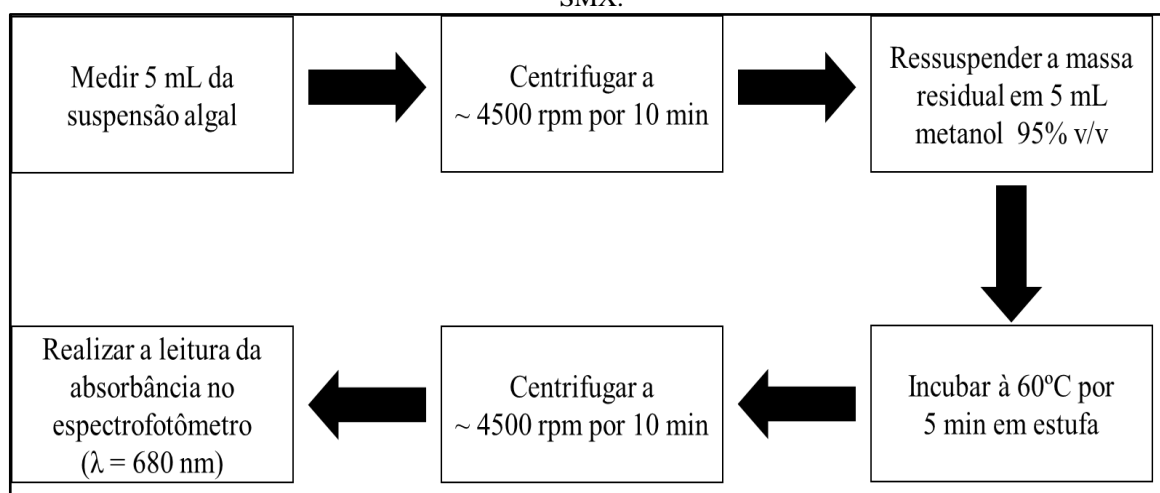
A taxa de crescimento espec\u00edfica da biomassa do cons\u00f3rcio microalgas-bact\u00e9rias (μ) foi determinada pela Equa\u00e7\u00e3o 5.2:

$$\mu = \frac{\ln C_1 - \ln C_0}{t_1 - t_0} \quad (\text{Equação 5.2})$$

em que, C_1 e C_0 representam a concentração de SST (mg L^{-1}) no tempo final (t_1) e tempo inicial (t_0), respectivamente.

As análises de densidade óptica foram realizadas no início do cultivo e nos dias 1, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16 e 20 do teste preliminar com SMX. As análises de densidade óptica foram realizadas pelo método colorimétrico, em comprimento de onda específico ($\lambda = 680 \text{ nm}$). As determinações dos valores de absorvância foram feitas utilizando-se o espectrofotômetro (HACH DR 6000®). Na Figura 5.6 é apresentado o fluxograma com as etapas envolvidas na determinação da densidade óptica (Xiong *et al.*, 2016b).

Figura 5.6 - Fluxograma apresentando as etapas para determinação da densidade óptica do teste preliminar com SMX.



Após determinadas as concentrações de SST e os respectivos valores de densidade óptica das amostras, foi plotado o gráfico: densidade óptica *versus* SST, visando verificar a existência de uma relação linear entre essas duas variáveis. É importante destacar que as alíquotas utilizadas nas análises de SST, densidade óptica e DQO foram retiradas de frascos de sacrifício.

5.6 Coleta dos Efluentes Secundários

As amostras de efluentes reais utilizadas neste estudo foram coletadas na ETE Marzagão, localizada no município de Itabirito/MG (Serviço Autônomo de Saneamento Básico - SAAE). Essa ETE possui as seguintes etapas de tratamento: i) tratamento preliminar com grades, desarenadores e peneiras ii) reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), iii) filtro biológico percolador (FBP) e iv) decantador secundário. As coletas dos efluentes foram

realizadas na calha Parshall de saída da ETE. O efluente coletado para as bateladas experimentais com cada antibiótico apresentou as seguintes características: i) baixo conteúdo de matéria orgânica (DQO ~ 70 mg L⁻¹); ii) concentrações de SST com concentrações variando entre 71,0 e 129,33 mg L⁻¹; iii) concentrações de OD variando entre 6,77 e 8,63 mg L⁻¹ e iv) valores de pH variando entre 7,98 e 8,61. Algumas características do efluente da ETE e do inóculo utilizado são apresentadas na Tabela 5.1. É importante destacar que as coletas foram feitas sempre no período da manhã (antes das 08:00 horas), sem chuva nas últimas 24 horas, sempre no dia em que se iniciava uma nova batelada de experimentos. Além disso, os valores iniciais de Clo *a* do inóculo variaram de 5,0 a 15,5 mg L⁻¹.

Tabela 5.1 - Características do efluente coletado da ETE Marzagão e do inóculo utilizado contendo o consórcio microalgas-bactérias para cada batelada experimental. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Batelada experimental	Data	Efluente da ETE				Inóculo	
		DQO (mg L ⁻¹)	SST (mg L ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	SST (mg L ⁻¹)	Clo <i>a</i> (mg L ⁻¹)
SMX	07/05/2019	73,7 ± 1,2	92,7 ± 7,0	7,3 ± 0,3	8,5 ± 0,04	425,0 ± 7,1	7,3 ± 0,2
TMP TMP/SMX	16/06/2019	73,0 ± 5,6	107,0 ± 4,2	6,8 ± 0,1	8,5 ± 0,05	340,0 ± 24,8	5,0 ± 0,5
CEF (7 dias)	06/08/2019	Nd	129,3 ± 5,2	8,1 ± 0,01	8,5 ± 0,01	370,0 ± 11,6	5,9 ± 0,2
ERI	09/09/2019	Nd	101,0 ± 17,0	7,4 ± 0,06	8,6 ± 0,01	640,0 ± 17,3	9,6 ± 0,1
CEF (4 dias)	05/12/2019	Nd	71,0 ± 11,7	8,6 ± 0,06	8,0 ± 0,06	425,0 ± 35,4	15,5 ± 1,3

Nd = não determinado.

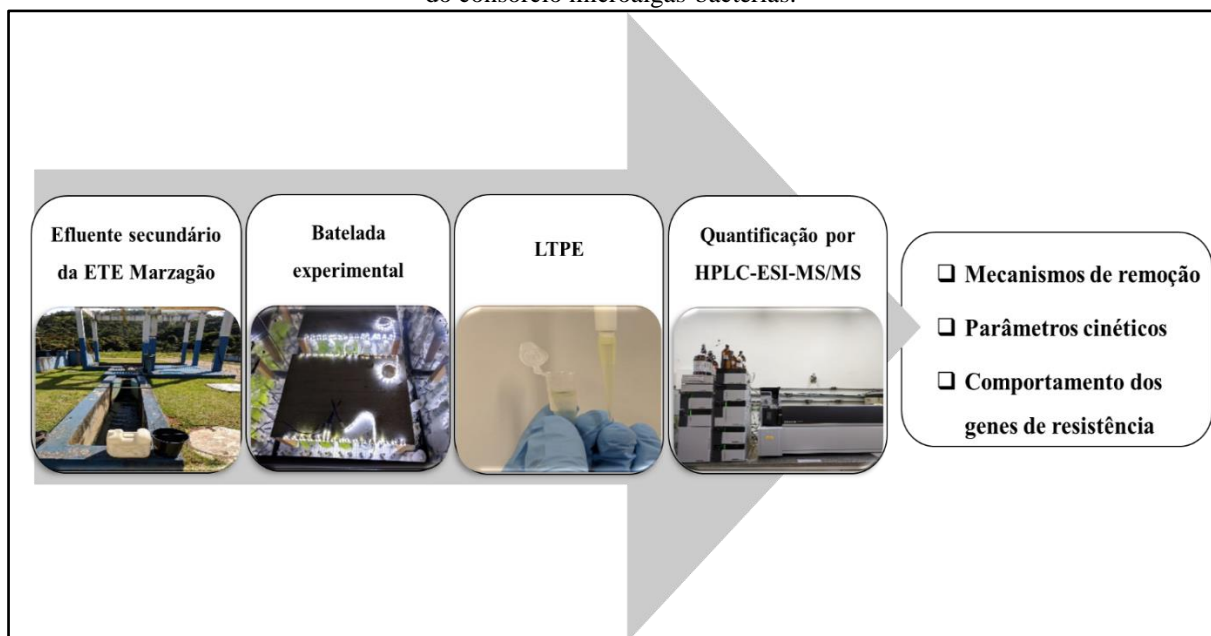
As análises de DQO para os cultivos fortificados com 50 µg L⁻¹ de SMX e TMP foram realizadas em triplicata, com a finalidade de estimar a quantidade de matéria orgânica presente inicialmente no efluente da ETE. Não foi avaliado a remoção durante o período de cultivo, visto que matéria orgânica presente no efluente da ETE apresentou elevado grau de recalcitrância, conforme observado em testes preliminares. As análises de SST foram realizadas através da

filtração de 20 mL da suspensão microalgas-bactérias, em membranas de fibra de vidro de 1,2 μm de porosidade (APHA, 2012).

5.7 Design Experimental

As bateladas experimentais foram realizadas com os antibióticos SMX, TMP, CEF, ERI e também com a mistura TMP/SMX. Os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias foram feitos em frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo um volume total de 200 mL de suspensão (inóculo + efluente da ETE). A concentração do inóculo foi de 10 % v/v em efluente da ETE, ou seja, 20 mL de inóculo e 180 mL do efluente coletado na ETE. Em cada batelada experimental, foram adicionados 200 μL de uma solução padrão de 50 mg L^{-1} do antibiótico selecionado, atingindo uma concentração final no sistema de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essa concentração foi escolhida, pois está mais próxima das concentrações reais comumente encontradas nos efluentes das ETEs. Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores iluminados com LED branco de baixa intensidade ($235 \pm 22 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A iluminação foi feita em ciclos de forma alternada, com auxílio de um temporizador, da seguinte forma: 16 horas de luz e 8 horas de escuro, assim como nos estudos realizados por Xiong *et al.* (2017b), Xiong *et al.* (2017c) e Xiong *et al.* (2019). Os cultivos foram incubados em *shaker*, em uma rotação de 150 rpm à 22 °C, durante um período de 7 dias. A Figura sumariza os procedimentos operacionais realizados para as bateladas experimentais, desde a coleta do efluente secundário até as análises de quantificação das concentrações residuais dos antibióticos selecionados. Para posteriormente, determinar os mecanismos envolvidos na remoção, parâmetros cinéticos e comportamento dos GRAs.

Figura 5.7 - Etapas necessárias para quantificar a concentração residual de cada antibiótico utilizando o cultivo do consórcio microalgas-bactérias.



Para investigar as interações bióticas existentes entre as microalgas e as bactérias presentes no consórcio e os fatores abióticos de remoção em cada batelada experimental, foram realizados controles nas mesmas condições mencionadas anteriormente, durante 7 dias de cultivo, como segue:

- i) Experimentos realizados no escuro. Os cultivos foram totalmente cobertos com papel alumínio para evitar a exposição à luz. Esses controles foram realizados para avaliar a influência da atividade heterotrófica realizada pelos microrganismos presentes no cultivo, principalmente, bactérias e microalgas. Uma vez que o crescimento das microalgas autotróficas fica comprometido devido à ausência de luz, que é essencial para o processo fotossintético;
- ii) Experimentos realizados com o efluente secundário sem a adição do inóculo. Esses controles tem como finalidade avaliar a remoção de cada antibiótico selecionado através da biodegradação pelos microrganismos presentes no próprio efluente da ETE;
- iii) Experimentos realizados com o efluente da ETE esterilizado (autoclave, à 120 °C por 20 minutos) e na água ultrapura sem a adição do inóculo. Esses controles foram realizados para avaliar a degradação abiótica e o efeito da matriz no processo de fotodegradação dos antibióticos selecionados.

Acrônimos para todos os experimentos realizados foram criados visando facilitar o entendimento dos resultados obtidos (Tabela 5.2). Os brancos (B) foram realizados nas mesmas condições de cultivo mencionadas anteriormente, mas sem a adição do antibiótico selecionado.

Todos os cultivos foram realizados em triplicata. Os acrônimos utilizados possuem os seguintes significados:

- 1) CL (consórcio-LED) - experimentos realizados com o consórcio microalgas-bactérias iluminados com LED;
- 2) CE (consórcio-escuro) - controles realizados com o consórcio microalgas-bactérias no escuro;
- 3) EL (efluente-LED) - controles realizados com o efluente da ETE, sem a adição do inóculo, iluminados com LED;
- 4) EEL (efluente esterilizado-LED) - controles realizados com o efluente da ETE esterilizado, sem a adição do inóculo, iluminados com LED;
- 5) AL (água-LED) - controles realizados em água ultrapura, sem a adição do inóculo, iluminados com LED.

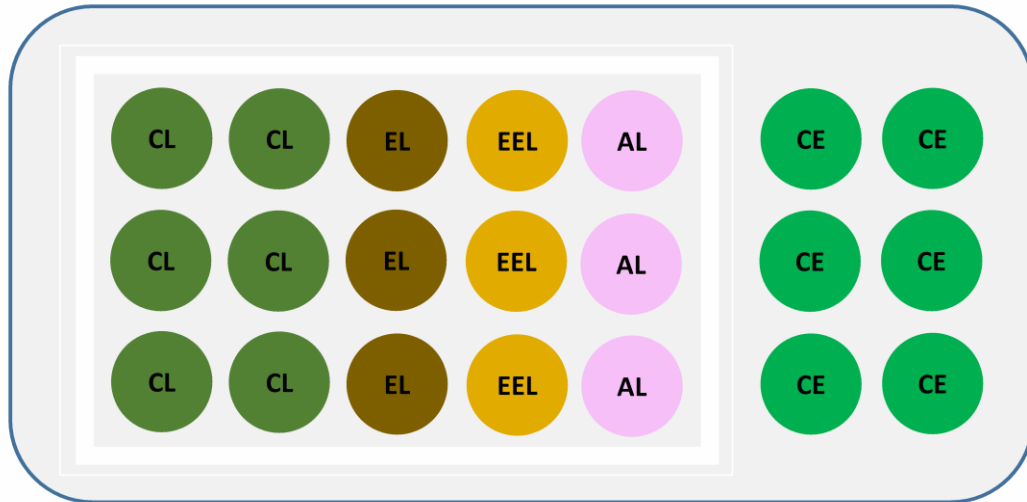
Tabela 5.2 - Acrônimos dos experimentos e controles realizados em cada batelada.

Antibióticos	Experimentos		Controles		
	Consórcio - LED (CL)	Consórcio - Escuro (CE)	Efluente - LED (EL)	Efluente Est.^a - LED (EEL)	Água^b - LED (AL)
SMX	CL-SMX	CE-SMX	EL-SMX	EEL-SMX	AL-SMX
TMP	CL-TMP	CE-TMP	EL-TMP	EEL-TMP	AL-TMP
TMP/SMX^c	CL-TS	CE-TS	EL-TS	EEL-TS	AL-TS
CEF	CL-CEF	CE-CEF	EL-CEF	EEL-CEF	AL-CEF
ERI	CL-ERI	CE-ERI	EL-ERI	EEL-ERI	AL-ERI

^a = Efluente esterilizado; ^b = Água ultrapura; ^c = mistura entre TMP e SMX (1:1).

Os fotobiorreatores foram incubados em *shaker* (Figura 5.8). Os experimentos foram realizados em triplicata, na qual os cultivos específicos CL e CE foram duplicados para todas as bateladas experimentais, pois foram utilizados como frascos de sacrifício para as análises de SST e Clo *a*.

Figura 5.8 – Vista superior do *shaker* contendo os fotobiorreatores e as respectivas identificações. O retângulo branco refere-se aos cultivos realizados sob iluminação LED.



5.8 Crescimento do Consórcio Microalgas-Bactérias nos Efluentes Secundários

A biomassa do consórcio microalgas-bactérias cultivada no efluente secundário foi determinada pela análise de SST, enquanto a biomassa microalgal foi determinada pela análise de Clo *a*. Ambos os testes foram realizados em triplicata no início e após 2, 4, 6 e 7 dias de cultivo. O monitoramento do crescimento do consórcio microalgas-bactérias é importante para avaliar possíveis efeitos tóxicos causados pela adição da concentração de cada antibiótico isolado, bem como da mistura TMP/SMX.

As análises de Clo *a* foram realizadas para determinar o crescimento indireto das microalgas autotróficas presentes no consórcio (Kurade *et al.*, 2019; Vo *et al.*, 2019). Os volumes aliquotados foram filtrados em membrana de fibra de vidro de 0,7 μm . Após realizado o procedimento de extração da Clo *a* (Nush, 1981), foram feitas as leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm no espectrofotômetro (HACH DR 6000[®]). Em seguida, fez-se a conversão dos valores de absorbância para concentração (mg L^{-1}) utilizando a Equação 5.3:

$$\text{Clo } a = \frac{29,6 \times [(E_{u665} - E_{u750}) - (E_{a665} - E_{a750})] \times 10}{V \times s} \quad (\text{Equação 5.3})$$

em que, E_u = valor da amostra não acidificada, E_a = valor da amostra acidificada, V = volume de amostra filtrada, 29,6 = coeficiente de absorção específica da Clo *a*, 10 = volume de etanol (80% v/v) utilizado na extração da Clo *a*, s = espessura da cubeta (1cm). É importante destacar que para determinar as concentrações de Clo *a* e SST foram utilizados frascos de sacrifício,

garantindo assim condições finais de cultivo similares ao início do experimento. Durante as bateladas experimentais foi observado que a perda por evaporação foi insignificante.

Com o objetivo de avaliar se o crescimento da biomassa microalgal no consórcio foi saudável determinou-se a razão entre as concentrações de Clo *a* e SST (Veloso *et al.*, 1991). De acordo com esses autores, a razão Clo *a*/SST é um parâmetro sensível, na qual valores de Clo *a*/SST maiores do que 1% indicam crescimento saudável do consórcio microalgas-bactérias. Enquanto, valores menores do que 1% indicam que o crescimento do consórcio foi prejudicado devido a algum fator de estresse (escassez de nutrientes, ausência de luz, presença de substâncias tóxicas, etc.). Os parâmetros OD e pH foram monitorados diariamente durante o período de cultivo.

5.9 Cromatografia de Íons e Teor de Carbono Orgânico total (COT)

As determinações de N (NH_4^+ e NO_3^-) e P (PO_4^{3-}) inorgânicos foram realizadas utilizando-se o cromatógrafo de íons (Methrom, Compact IC Flex 930), equipado com amostrador automático e detector de condutividade. Inicialmente, alíquotas de 10 mL do cultivo foram filtradas em membranas de papel de 0,45 μm e acondicionadas a $\sim 4^\circ\text{C}$ até o momento das análises. Para a determinação dos íons de interesse as amostras coletadas foram previamente diluídas (10x) em água ultrapura. Os ânions NO_3^- e PO_4^{3-} foram determinados utilizando-se uma coluna Metrosep A Supp 5 - 150/4 mantida a 30°C . Utilizou-se como FM uma solução de Na_2CO_3 ($3,20 \text{ mmol L}^{-1}$) e NaHCO_3 ($1,00 \text{ mmol L}^{-1}$), a um fluxo total de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. O cátion NH_4^+ foi determinado utilizando-se uma coluna Metrosep C4 - 150/4.0 mantida a 30°C , em que foi utilizada uma solução de ácido nítrico ($1,70 \text{ mmol L}^{-1}$) e ácido dipicolínico ($0,70 \text{ mmol L}^{-1}$) como FM, sendo o fluxo total de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$.

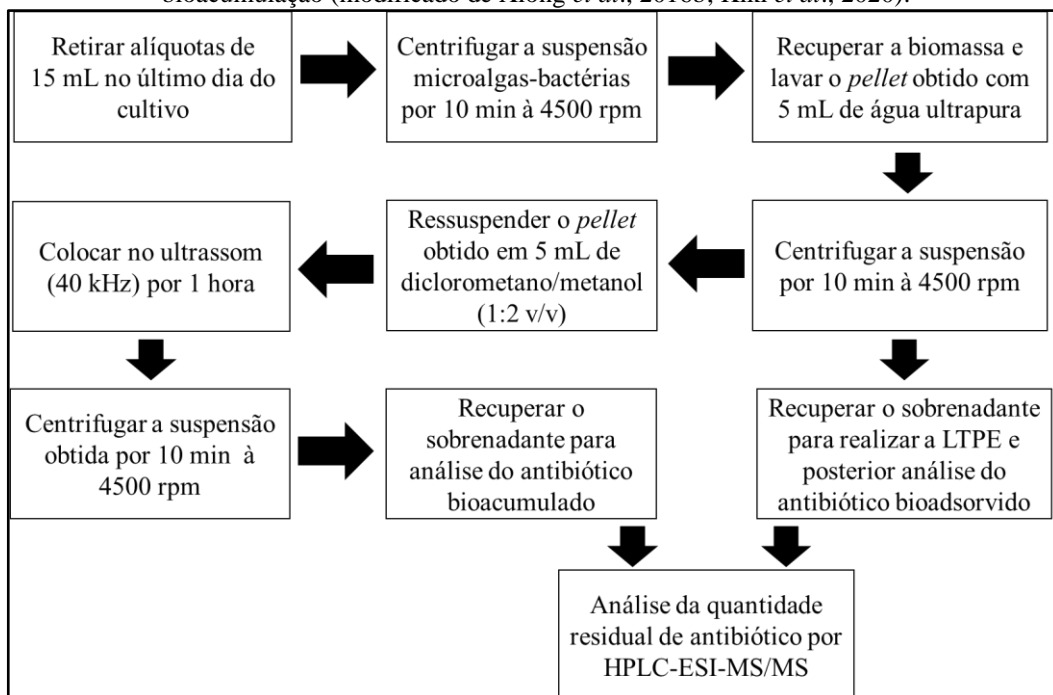
As análises do teor de carbono total (CT), carbono orgânico total (COT) e carbono inorgânico (CI) foram realizadas, em triplicata, para os cultivos fortificados com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de CEF e ERI. As amostras coletadas foram previamente diluídas (5x) em água ultrapura. Essas análises foram feitas para os experimentos sob iluminação LED e para os controles realizados no escuro. As determinações de COT foram feitas indiretamente pela diferença entre o teor de CT e o teor de CI utilizando o analisador TOC-L (Shimadzu, Japão).

5.10 Mecanismos de Remoção dos Antibióticos Selecionados

Alíquotas de cada cultivo foram retiradas em triplicata diariamente para avaliar a concentração residual dos antibióticos. Os mecanismos de remoção considerados nesse estudo

incluem a via biológica (bioadsorção, bioacumulação e biodegradação) e os fatores abióticos. Na Figura 5.9 é apresentado um fluxograma com as etapas envolvidas nos mecanismos de degradação por bioadsorção e bioacumulação dos antibióticos selecionados.

Figura 5.9 - Fluxograma apresentando as etapas dos mecanismos de remoção dos antibióticos por bioadsorção e bioacumulação (modificado de Xiong *et al.*, 2016b; Kiki *et al.*, 2020).



A porcentagem de remoção por biodegradação de cada antibiótico foi calculada utilizando a Equação 5.4 (Xiong *et al.*, 2016b):

$$B_d (\%) = \frac{(A_0 - A_r - A_d - A_c - A_f)}{A_0} \times 100 \quad (\text{Equação 5.4})$$

em que, A_0 é a concentração inicial de cada antibiótico; A_r é a concentração residual de cada antibiótico no último dia de cultivo; A_d é a quantidade de antibiótico bioadsorvida no último dia de cultivo; A_c é a quantidade de antibiótico bioacumulado; e A_f é a quantidade de antibiótico removida pelos fatores abióticos.

Experimentos controle com o efluente secundário esterilizado e com água ultrapura foram realizados sob iluminação LED para avaliar o efeito da matriz na degradação abiótica dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI. Alíquotas de 600 μ L do efluente esterilizado foram retiradas apenas no início e no final de cada experimento, sendo esses testes realizados em quintuplicata. Os experimentos realizados em água ultrapura foram feitos em triplicata, retirando-se alíquotas diárias de 600 μ L durante o período de cultivo.

5.11 Avaliação da Cinética de Remoção dos Antibióticos Seleccionados pelo Consórcio Microalgas-Bactérias

Os fotobiorreatores foram colocados no *shaker* com agitação controlada (150 rpm) e temperatura constante (22 °C) durante o período de cultivo. A cinética de remoção dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI foi determinada retirando-se alíquotas diárias de 600 µL de cada fotobiorreator durante sete dias de cultivo. A batelada experimental com a CEF também foi realizada durante quatro dias (96 horas), sendo retiradas um total de 10 alíquotas (início do cultivo, após 6, 12, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96 horas). A realização desse teste foi necessária, uma vez que a CEF foi quase totalmente removida em apenas 3 dias de cultivo, como será discutido posteriormente no capítulo 6.

A cinética de remoção dos antibióticos seleccionados pelo consórcio microalgas-bactérias foi calculada através de um modelo cinético de primeira ordem (Equação 5.5). Esse modelo cinético mostrou-se aplicável para remoção de MPEs utilizando tecnologias baseadas em microalgas (Xiong *et al.*, 2016a; Xiong *et al.*, 2016b).

$$\ln C_t = -kt + \ln C_0 \quad (\text{Equação 5.5})$$

Em que, C_0 é a concentração inicial do antibiótico no tempo zero, C_t é a concentração do antibiótico no tempo t ; k (d^{-1}) é a constante da taxa de remoção e t é o período de remoção em dias. A concentração residual de cada antibiótico (C_t/C_0) *versus* o tempo foi plotada para cada batelada experimental. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado pela Equação 5.6:

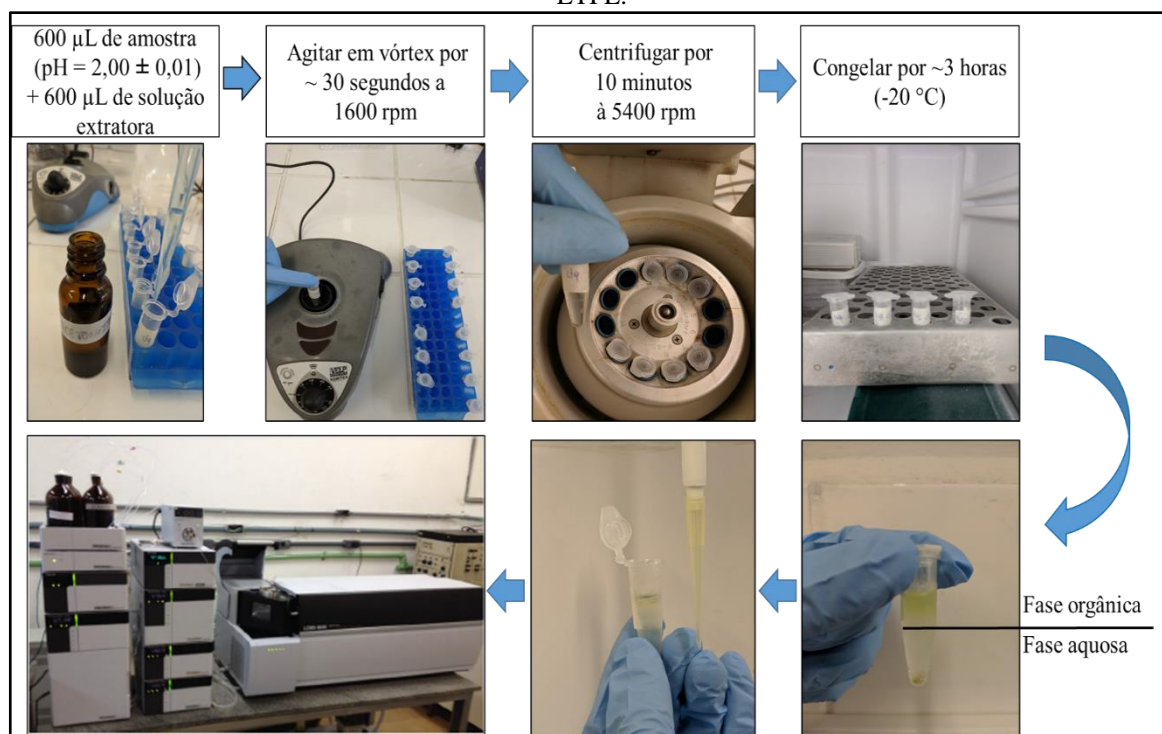
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Equação 5.6})$$

5.12 Preparo das Amostras por LTPE

A LTPE foi utilizada como preparo de amostras para todas as bateladas experimentais. O procedimento experimental da LTPE é ilustrado na Figura 5.10. Inicialmente, foram retiradas alíquotas de 600 µL de cada cultivo, sendo as mesmas acidificadas em pH $2,00 \pm 0,01$ pela adição de ácido clorídrico (HCl 1:1 v/v), exceto para a batelada experimental com a ERI, visto que esse antibiótico é degradado em pH $< 4,5$ (Dinh *et al.*, 2011). Fez-se a transferência de cada amostra juntamente com 600 µL de uma solução extratora (metanol 10 % v/v em ACN) para um tubo eppendorf® de 2 mL. Em seguida, homogeneizou-se em vórtex à 1500 rpm por aproximadamente 30 segundos e fez-se a centrifugação à 5400 rpm por 10 minutos (centrífuga eppendorf®). Posteriormente, a mistura obtida foi levada ao *freezer* a uma temperatura de

aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por no mínimo 3 horas, visando garantir a completa separação entre as fases aquosa e orgânica. É importante destacar que o congelamento completo da fase aquosa é necessário para garantir repetibilidade entre as extrações. Retirou-se cuidadosamente $100\text{ }\mu\text{L}$ na superfície da fase orgânica, com o auxílio de uma micropipeta, e fez-se a transferência para *insert* de $200\text{ }\mu\text{L}$. Por fim, as amostras foram acondicionadas no *freezer* a $\sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises de quantificação que foram realizadas no HPLC-ESI-MS/MS (LC-MS 8040, Shimadzu).

Figura 5.10 - Fluxograma apresentando as etapas envolvidas no procedimento de preparo das amostras por LTPE.



5.12.1 Recuperação para LTPE dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI

A recuperação é um parâmetro utilizado para avaliar a exatidão de um método analítico quando não se tem um CRM adequado e/ou disponível. Isso acontece quando se trabalha com matrizes complexas, como a suspensão microalgas-bactérias (efluente da ETE + inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias) utilizada no presente estudo. Sendo assim, a recuperação da LTPE foi determinada adicionando $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ dos antibióticos SMX, TMP, CEF, ERI e $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura TMP/SMX nas diferentes matrizes de estudo (suspensão microalgas-bactérias, efluente da ETE e água ultrapura). As recuperações foram determinadas, em triplicata, no início do cultivo de cada batelada experimental. É importante destacar que foi

feito a LTPE para os brancos (matriz sem adição do (s) analito (s) de interesse). A recuperação foi determinada pela equação 5.7:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{amostra}} - C_{\text{branco}}}{C_{\text{analito}}} \quad (\text{Equação 5.7})$$

em que: C_{amostra} = concentração do analito no extrato da amostra; C_{branco} = concentração do analito no extrato da matriz sem adição do analito; e C_{analito} = concentração inicial do analito (concentração do analito presente na matriz + concentração do analito adicionada).

5.13 Condições Cromatográficas e de Espectrometria de Massas

As análises quantitativas dos antibióticos selecionados foram realizadas em HPLC-ESI-MS/MS (LC-MS 8040, Shimadzu®). Utilizou-se o cromatógrafo líquido HPLC Nexera X2 (Shimadzu®), equipado com um amostrador automático (modelo SIL-30AC), sistema binário de bombas (modelo LC-30AD) e forno para coluna cromatográfica (modelo CTO-30A).

Para determinar as melhores condições de cromatografia, além da coluna cromatográfica e da fase móvel outros parâmetros também foram avaliados: i) modificador de fase, ii) fluxo da fase móvel, iii) gradiente de eluição, a partir da variação da concentração da fase orgânica (% B) e iv) o tempo de análise. A temperatura do forno contendo a coluna cromatográfica foi mantida a 40 °C.

O espectrômetro de massas utilizado possui o analisador de massas triploquadrupolo (QqQ), em que: (i) o primeiro quadrupolo (Q1) – é responsável por fazer a seleção dos íons precursores; ii) célula de colisão (q) – é utilizada para fragmentar os íons precursores selecionados no Q1, sendo utilizado o argônio (Ar) como gás de colisão e iii) segundo quadrupolo (Q3) – é responsável por realizar a seleção dos principais fragmentos gerados na célula de colisão, para posteriormente serem detectados.

As condições ótimas do espectrômetro de massas foram definidas pela injeção direta de soluções padrão na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de cada antibiótico selecionado. Em seguida, determinou-se as razões massa-carga (m/z) e o modo de ionização de cada antibiótico. Posteriormente, foi feita a otimização das condições do triploquadrupolo para o modo de Monitoramento de reações múltiplas (MRM - *multiple reaction monitoring*), sendo determinado os três fragmentos de maior intensidade. O fragmento mais intenso foi utilizado para quantificação e os outros dois para confirmação das analitos de interesse. Por fim, as análises foram realizadas no modo varredura (*Scan*) e no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM - *Selected Ion Monitoring*). Os parâmetros do espectrômetro de massas

considerados incluem: energia de ionização (voltagem), as temperaturas da linha de dessolvatação (DL - *desolvation line*) e do bloco de aquecimento (*heat block*) e os fluxos do gás de nebulização e de secagem. Esses parâmetros, bem como as condições utilizadas para otimização do método são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Parâmetros e condições do espectrômetro de massas utilizadas na otimização.

Parâmetros	Condições do espectrômetro de massas
Temperatura da DL	230 °C
Fluxo do gás de nebulização (N ₂)	3 L min ⁻¹
Fluxo do gás de secagem (N ₂)	15 L min ⁻¹
Temperatura do heat block	400 °C
Voltagem da fonte de ionização	4,5 kV

A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm, Shimpack® XR-ODSIII), mantida a 40 °C. Para todos os métodos foi empregada a seguinte fase móvel: i) fase aquosa (A): água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico; ii) fase orgânica (B): acetonitrila (ACN) com 0,1% de ácido fórmico. Foram utilizados os seguintes gradientes de eluição:

- 1) **SMX:** 5 a 95% B de 0,01 a 1,00 min, mantém a 95% B de 1,00 a 3,50 min, 95 a 5% B de 3,50 a 4,50 min, mantém a 5% B de 4,50 a 5,30 min;
- 2) **TMP/SMX:** 5% B de 0,01 a 1,00 min, 5 a 95% B de 1,00 a 3,50 min, mantém a 95% B de 3,50 a 5,00 min, 95 a 5% B de 5,00 a 6,00 min, mantém a 5% B de 6,00 a 7,00 min;
- 3) **CEF:** 5% B de 0,01 a 1,00 min, 5 a 95% B de 1,00 a 3,50 min, mantém a 95% B de 3,50 a 5,50 min, 95 a 5% B de 5,50 a 6,50 min, mantém a 5% B de 6,50 a 7,50 min;
- 4) **ERI:** 5% B de 0,01 a 1,00 min, 5 a 95% B de 1,00 a 3,00 min, mantém a 95% B de 3,00 a 6,00 min, 95 a 5% B de 6,00 a 8,00 min, mantém a 5% B de 8,00 a 9,00 min.

Sendo assim, os tempos totais da análise cromatográfica foram iguais a 5,30 min (SMX) 7,00 min (TMP/SMX), 7,50 min (CEF) e 9,00 min (ERI). O fluxo total foi de 0,20 mL min⁻¹ para os métodos de quantificação do SMX e TMP/SMX, enquanto para CEF e ERI o fluxo total foi de 0,25 mL min⁻¹. O volume total de injeção foi de 15 µL, exceto para o método desenvolvido para quantificação da ERI, na qual o volume total de injeção foi igual a 7 µL.

5.13.1 Quantificação dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI

Nas análises em que se utiliza a cromatografia acoplada a espectrometria de massas o efeito matriz não pode ser desconsiderado, principalmente quando se trabalha com matrizes complexas, tais como a utilizada neste estudo (efluentes de ETEs juntamente com inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias). Sendo assim, torna-se necessário corrigir os efeitos da matriz que acontecem, principalmente, no processo de ionização dos analitos. Comumente, utiliza-se para corrigir o efeito matriz o método de calibração com padrão interno, em que o analito é marcado com C^{13} ou H^2 . Porém é difícil encontrar o padrão interno ideal para amostras complexas e o mesmo quando está disponível apresenta um elevado custo (Gomes *et al.*, 2017).

A quantificação das concentrações residuais dos antibióticos TMP, SMX, CEF e ERI foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Gomes *et al.* (2017). Essa metodologia consiste na injeção dupla consecutiva para o preparo da curva analítica e também para a quantificação da concentração de antibióticos nas amostras. A injeção dupla consecutiva consiste em adicionar uma quantidade fixa de solvente na primeira injeção e uma quantidade fixa de um padrão preestabelecido (*spike*) na segunda injeção, conforme pode ser observado na Tabela 5.4.

O volume total de injeção foi igual 15 μL para os testes realizados com o SMX, TMP e CEF. na primeira injeção (10 μL de cada ponto da curva analítica ou amostra + 5 μL de solvente) e na segunda injeção também foi injetado um volume total de 15 μL (10 μL de cada ponto da curva analítica ou amostra + 5 μL do *spike*). Neste estudo, ao invés de se usar um solvente específico, foi utilizada uma solução (10% metanol v/v em acetonitrila). O *spike* utilizado corresponde a uma concentração de $\frac{1}{4}$ do ponto mais elevado da curva, ou seja, se o ponto mais elevado da curva for 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ utiliza-se se um *spike* com concentração de 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. A injeção dupla é feita sequencialmente, dessa forma consegue-se corrigir o efeito matriz, pois assume-se que as mesmas oscilações que acontecem na 1ª injeção também ocorrem na 2ª injeção.

Tabela 5.4 - Preparo da curva de calibração e quantificação dos antibióticos selecionados pelo método da injeção dupla consecutiva.

Injeção	Volume fixo da solução ^a na 1 ^a injeção (µL) e volume fixo do <i>spike</i> na 2 ^a injeção (µL)	Volume fixo do padrão (µL) de um determinado ponto da curva ou volume fixo da amostra (µL)
Preparo da curva analítica		
1 ^a	5	10
2 ^a	5	10
Análise das amostras		
1 ^a	5	10
2 ^a	5	10

^a = volume fixo de solução metanol 10% v/v em ACN.

Para os testes realizados com a ERI o volume total de injeção foi igual a 7 µL (5 µL de cada ponto da curva analítica ou amostra + 2 µL do solvente ou *spike*). Após feita a injeção dupla consecutiva, determinou-se a razão entre as áreas da 1^a injeção e a diferença entre as áreas da 2^a injeção e da 1^a injeção, conforme apresentado na Equação 5.8. Os valores das razões de áreas obtidas *versus* concentração (µg L⁻¹) dos pontos da curva foram utilizados para construção da curva de calibração. O mesmo procedimento foi feito com as amostras de cada cultivo.

$$\text{Razão entre áreas} = \frac{1^{\text{a}} \text{ injeção}}{(2^{\text{a}} \text{ injeção} - 1^{\text{a}} \text{ injeção})} \quad (\text{Equação 5.8})$$

As curvas de calibração para os antibióticos SMX e TMP foram preparadas com 7 pontos (concentrações de: 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0 e 50,0 µg L⁻¹). As curvas de calibração para os antibióticos CEF e ERI foram preparadas com 8 pontos (concentrações de: 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 e 50,0 µg L⁻¹). Todas as curvas foram preparadas em triplicata, sendo calculado o coeficiente de determinação (R²) para cada curva analítica.

5.14 Quantificação dos GRAs por qPCR

5.14.1 Preparo das amostras e extração de DNA

As quantificações dos GRAs foram determinadas para as bateladas experimentais realizadas com os antibióticos SMX, TMP/SMX, CEF e ERI. Retirou-se alíquotas de 10 mL, apenas no início e no último dia de cultivo, para os experimentos realizados sob iluminação

LED. Inicialmente, fez-se a filtração em seringa de cada amostra utilizando membranas de fibra de vidro de 0,22 µm. Em seguida, as membranas contendo o material filtrado foram transferidas para microtubos para posterior extração do DNA. O DNA de cada amostra foi extraído utilizando-se o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®) de acordo com os protocolos do fabricante. O extrato total de DNA foi quantificado usando um espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) na faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm. Em seguida, os extratos de DNA foram diluídos até uma concentração final de 5 ng µL⁻¹.

5.14.2 qPCR em tempo real

As análises de quantificação de genes foram realizadas por qPCR em tempo real (*Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time*) usando o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). As análises de qPCR foram realizadas no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM/ICEB/UFOP) coordenado pela Professora Silvana de Queiroz Silva. As análises de qPCR foram feitas para os cultivos fortificados com SMX, TMP/SMX, CEF e ERI. Portanto, foram usados os seguintes *primers* (iniciadores de amplificação): *sulI* (sulfonamidas, SMX), *bla_{TEM}* (beta-lactâmicos, CEF) e *ermB* (gene de resistência associado à ERI). Também foi utilizado o *primer* referente ao RNA ribossomal 16S (RNAr 16S), com o objetivo de estimar a quantidade total de bactérias presentes no cultivo. As características dos *primers* utilizados são apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Características dos *primers sulI, ermB, bla_{TEM}* e RNAr 16s utilizados no presente estudo.

Genes	<i>Primers</i>	Sequência	Temp. (°C) anelamento	Amplicon (pb) ^a	Referência
<i>RNAr</i>	1055 fw	ATGGCTGTCGTCAGCT	53	337	(Ferris <i>et al.</i> , 1996)
<i>16S</i>	1392 rv	ACGGGCGGTGTGTAC			
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> fw ^b	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	55,8	163	(Mao <i>et al.</i> , 2015)
	<i>sulI</i> rv ^c	TGAAGTTCCGCCCAAGGCTCG			
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> fw	CGTGCGTCTGACATCTATCTGA	56,8	190	(Mao <i>et al.</i> , 2015)
	<i>ermB</i> rv	CTGTGGTATGGCGGGTAAGTT			
<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM}</i> fw	GCACGAGTGGGTTACATCGA	48	311	(Tao <i>et al.</i> , 2014)
	<i>bla_{TEM}</i> rv	GGTCCTCCGATCGTTGTCAG			

^a = pares de base, ^b = *forward*, ^c = *reverse*.

Para cada análise de qPCR foram utilizados 3,8 µL de água ultrapura; 5,0 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix; 0,1 µL de cada par de *primer* (30 µM); e 1,0 µL de

amostra de DNA ($5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Os controles positivos utilizados para construção das curvas padrão foram obtidos pela clonagem do produto da qPCR em vetor plasmidial (kit *pGem Easy Vector*, Promega) e inseridos em bactérias *E. coli* JM109, seguindo o protocolo do fabricante.

5.15 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados com o valor médio e desvio padrão. Em alguns casos foram determinados os valores do coeficiente de variação (CV%), também denominado de desvio padrão relativo (RSD - *Relative Standard Deviation*). Os gráficos foram obtidos utilizando-se o *software Graph Pad Prism* versão 6.0. Os *p*-valores menores do que 0,05 ($p < 0,05$) indicam diferenças significativas. As correlações entre as análises de SST e Clo *a* foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Pearson (*r*). As análises estatísticas foram realizadas pelo *software Minitab 17 Statistical*.

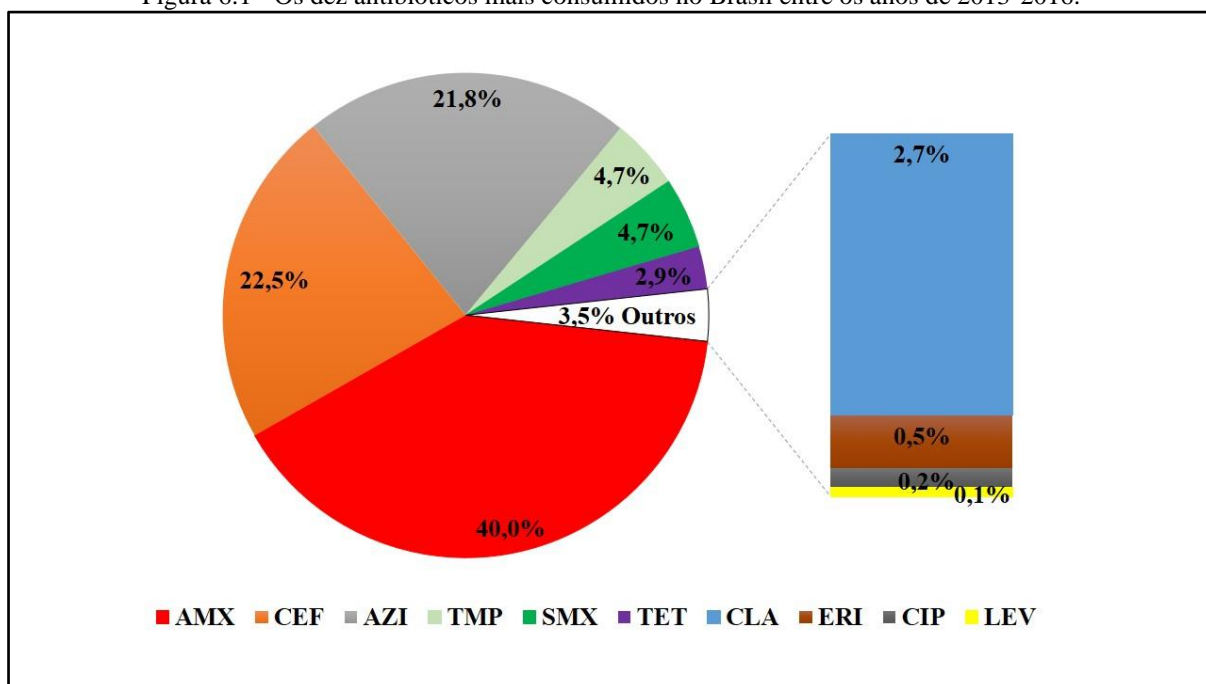
A aquisição de dados do HPLC-ESI-MS/MS e integração dos picos obtidos foram determinadas utilizando-se o *software LabSolution* (Shimadzu).

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Escolha dos Antibióticos para Estudo

As informações fornecidas pela ANVISA sobre a dispensação de antibióticos foram compiladas. Os dez antibióticos mais consumidos, em ordem decrescente de dispensação, entre os anos de 2013 a 2016 foram: amoxicilina (AMX), cefalexina (CEF), azitromicina (AZI), trimetoprima (TMP), sulfametoxazol (SMX), tetraciclina (TET), claritromicina (CLA), eritromicina (ERI), ciprofloxacina (CIP) e levofloxacina (LEV), conforme pode ser observado na Figura 6.1. Devido à falta de informações sobre o consumo nacional de antibióticos na literatura e a importância do assunto no cenário mundial, principalmente, no que tange o aumento da resistência bacteriana, foi publicado na revista científica *Environmental Science and Pollution Research* o artigo intitulado: “Antibiotics consumption in developing countries defies global commitments: an overview on Brazilian growth in consumption” (Neves e Castro *et al.*, 2020).

Figura 6.1 - Os dez antibióticos mais consumidos no Brasil entre os anos de 2013-2016.



Dentre os dez antibióticos mais consumidos nacionalmente, foram selecionados quatro antibióticos para serem objetos de estudo, são eles: SMX, TMP, CEF e ERI. Esses antibióticos representam classes distintas, em relação a estrutura química, além de serem frequentemente detectados em diversas matrizes aquosas ambientais, inclusive nos efluentes de ETEs, conforme apresentado anteriormente na Tabela 3.3 (seção 3.2.2 “A presença de antibióticos em matrizes

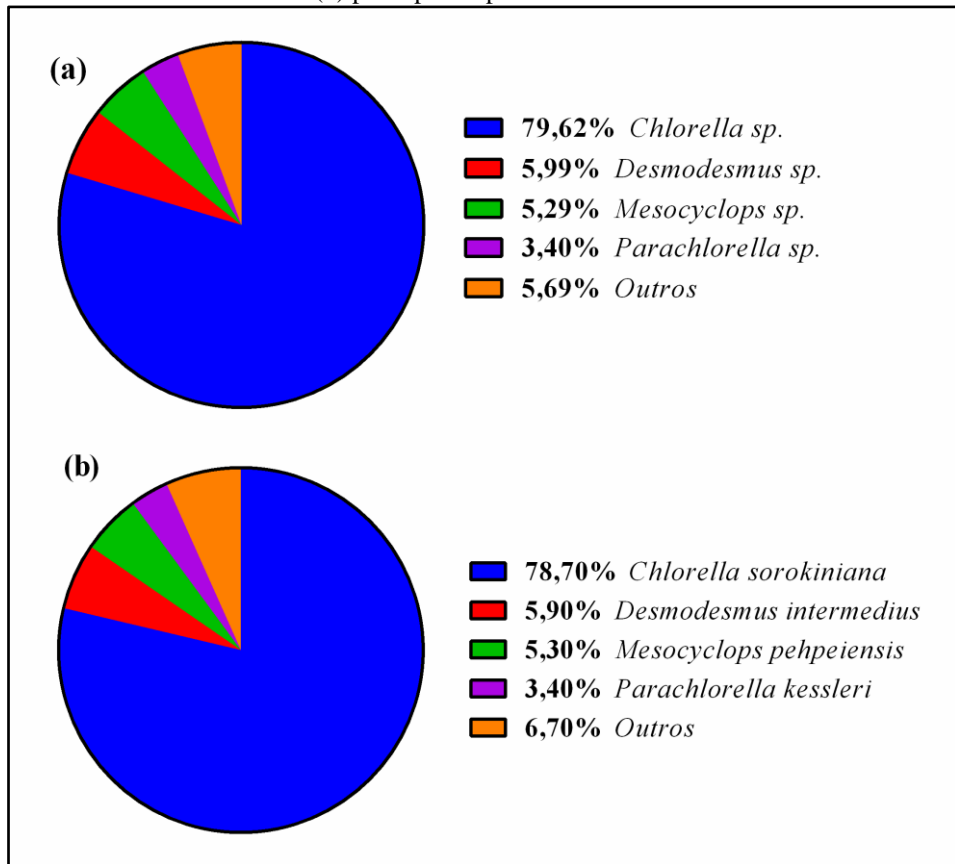
aquosas”). A TMP foi escolhida por ser comumente coadministrada juntamente com o SMX, no medicamento conhecido popularmente como Bactrim®.

Observa-se que os antibióticos mais consumidos no Brasil e em alguns países europeus (Alemanha, Itália, França, Portugal e Reino Unido) pertencem as mesmas subclasses: penicilinas, macrolídeos e quinolonas (Van Boeckel *et al.*, 2014, ECDC, 2018). De forma geral, o Brasil apresentou um aumento no consumo de antibióticos de 18%, entre os anos de 2013 e 2016 (Neves e Castro *et al.*, 2020). Embora esse aumento esteja menor do que o crescimento mundial (36% entre os anos de 2000 e 2010) (Van Boeckel *et al.*, 2014), o crescimento no consumo de antibióticos no Brasil é bastante superior aquele de países mais desenvolvidos, como os mencionados anteriormente. Esse resultado está associado diretamente com campanhas científico-governamentais que objetivam tanto a medicina preventiva, evitando o afastamento do cidadão produtivo, quanto a educação da população sobre os prejuízos que podem ser causados pelo consumo inadequado dos antibióticos e de outros medicamentos.

6.2 Identificação dos Principais Microrganismos Presentes no Inóculo

A identificação dos principais microrganismos presentes no inóculo foi feita conforme descrito anteriormente na seção 5.4.1. A *Chlorella sp.* foi o gênero predominante entre as microalgas, correspondendo a 79,62% (Figura 6.2a) e a principal espécie de microalgas identificada no inóculo foi a *Chlorella sorokiniana* (78,70%) (Figura 6.2b).

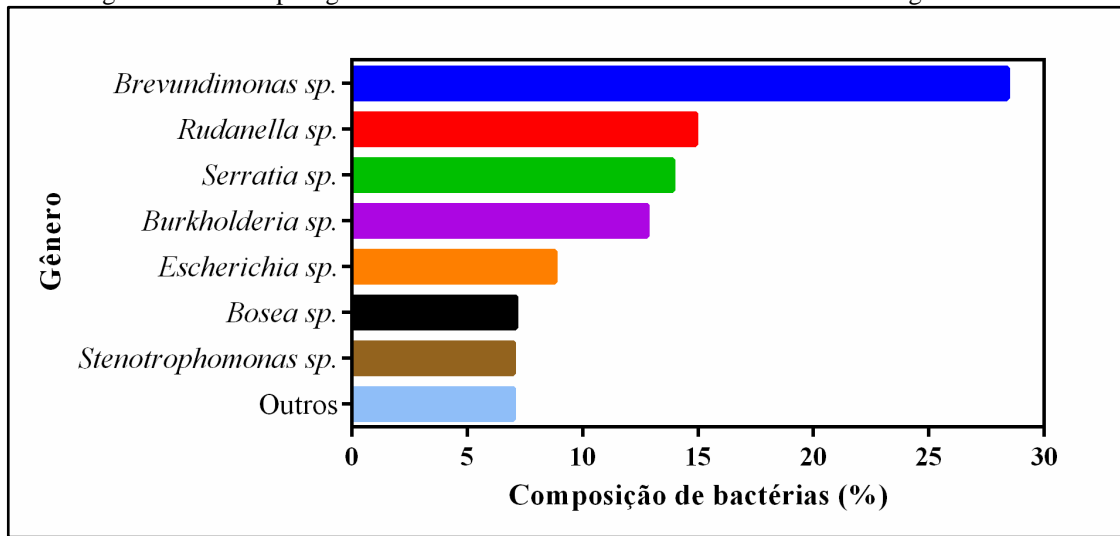
Figura 6.2 - Caracterização das microalgas presentes no consórcio microalgas-bactérias, (a) principais gêneros e (b) principais espécies.



Morita *et al.* (2000) reportaram que a espécie de microalgas *Chlorella sorokiniana* possui alta produtividade fotossintética. Segundo esses autores, as maiores taxas de crescimento específico (μ) foram obtidas em valores de pH = 6,00 a 35 °C, em um meio com 5% de CO₂. Valores de pH = 3 e temperaturas elevadas prejudicam drasticamente o crescimento destas espécies de microalgas. A *Chlorella sorokiniana* é amplamente reportada na literatura, inclusive existem estudos que avaliaram o cultivo dessa espécie em esgoto e efluentes de ETEs para remoção de MPEs, incluindo os antibióticos (de Wilt *et al.*, 2016; Jaén-Gil *et al.*, 2018).

As principais bactérias identificadas no inóculo foram *Brevundimonas sp.* (28,40%) e *Rudanella sp.* (14,90%), conforme apresentado na Figura 6.3.

Figura 6.3 - Principais gêneros de bactérias encontrados no consórcio microalgas-bactérias.



As bactérias *Brevundimonas sp.* são gram-negativas, aeróbias e não fermentativas. Essas bactérias são resistentes aos antibióticos β -lactâmicos e fluoroquinolonas. Esse gênero de bactéria foi isolado de diversos ambientes (solos, lodos ativados, ambientes aquáticos e água purificada). As temperaturas ótimas de crescimento da *Brevundimonas sp.* variam entre 30 e 37 °C (Ryan e Pembroke, 2018).

A bactéria *Rudanella sp.* foi a segunda mais abundante no inóculo em estudo, sendo a *Rudanella lutea* a espécie predominante. Essa bactéria é gram-negativa e estritamente aeróbica. Weon *et al.* (2008) isolaram *Rudanella lutea* em uma amostra de ar na Coreia. Esses autores avaliaram as condições de crescimento dessa espécie de bactérias, na qual as temperaturas foram variadas de 4 e 40 °C e o pH entre 6,0 e 9,0. As condições ótimas de crescimento foram obtidas em pH = 7,0 a uma temperatura de 30 °C (Weon *et al.*, 2008).

Park *et al.* (2008) isolaram oito cepas de bactérias em uma cultura laboratorial da espécie de microalgas *Chlorella ellipsoidea*. As bactérias *Brevundimonas sp.* encontradas na cultura proporcionaram um crescimento das microalgas três vezes maior quando comparado ao crescimento da espécie de microalgas isolada. Os resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidos por Park *et al.* (2008) evidenciaram a adesão dessas bactérias nas células das microalgas. Estes autores propuseram que esta adesão direta das bactérias pode reduzir a distância de difusão, resultando numa troca mais eficiente de substratos. De acordo com o estudo de revisão de Tate *et al.* (2013), as bactérias *Brevundimonas sp.* tem sido identificadas em culturas de microalgas do gênero *Chlorella*, promovendo o crescimento das mesmas. Esses resultados reforçam a existência de uma relação simbiótica entre as microalgas

Chlorella sp. e as bactérias *Brevundimonas sp.*, que são os microrganismos predominantes no inóculo que foi utilizado na presente pesquisa.

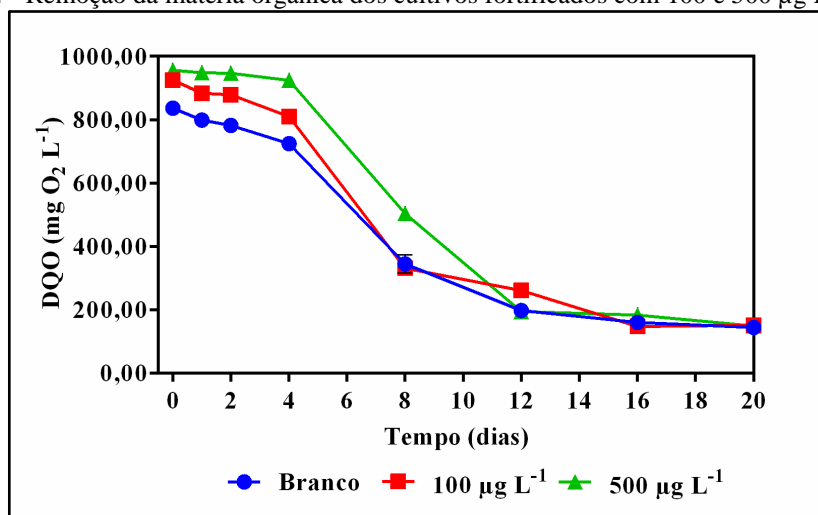
6.3 Testes Preliminares com SMX

A realização dos testes preliminares foi importante para se conhecer o comportamento do consórcio microalgas-bactérias na presença do SMX em duas concentrações, bem como determinar se as concentrações utilizadas do antibiótico inibiam o crescimento do consórcio. Além disso, os testes preliminares foram determinantes para auxiliar na escolha dos parâmetros operacionais realizados com os fotobiorreatores contendo o cultivo do consórcio nos efluentes secundários reais.

6.3.1 Demanda química de oxigênio (DQO)

As concentrações iniciais da matéria orgânica foram determinadas pela análise de DQO, com valores variando entre 836,9 - 956,3 mg L⁻¹. As concentrações da matéria orgânica diminuíram ao longo do cultivo, conforme pode ser observado na Figura 6.4. A eficiência de remoção da matéria orgânica foi calculada a partir da Equação 5.1, na qual esses valores foram iguais a 82,7, 83,6 e 84,4% para o branco e para os cultivos em que foram adicionados 100 e 500 µg L⁻¹ de SMX, respectivamente.

Figura 6.4 - Remoção da matéria orgânica dos cultivos fortificados com 100 e 500 µg L⁻¹ de SMX.



6.3.2 Crescimento do consórcio microalgas-bactérias

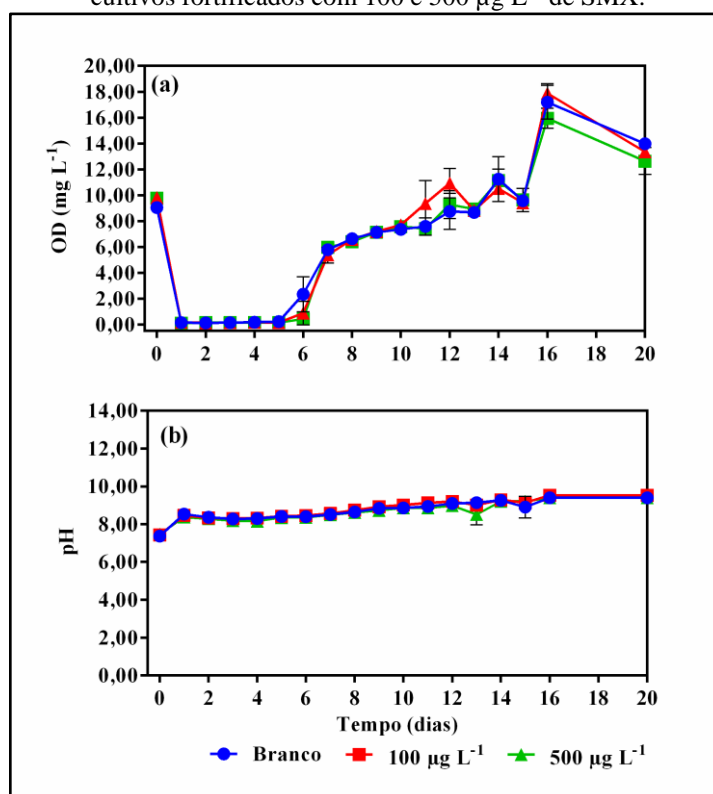
As variáveis pH, OD e temperatura foram monitoradas diariamente durante 16 dias de cultivo, e também no 20º dia. As concentrações iniciais de OD foram iguais a 9,05, 9,81 e 9,77 mg L⁻¹ para o branco (sem adição de SMX) e para os cultivos fortificados com 100 e

500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX, respectivamente. Após o 1º dia de cultivo, a quantidade de OD no meio diminuiu abruptamente, apresentando concentrações de OD próximas a zero para todos os cultivos (Figura 6.5a). De acordo com Wang *et al* (2016), a redução da concentração de oxigênio no meio ocorre devido a degradação da matéria orgânica pela atividade microbiana. É importante ressaltar que neste teste preliminar o cultivo foi preparado com esgoto sintético com uma concentração de matéria orgânica de aproximadamente 1000 mg L^{-1} em termos de DQO. Os valores de OD mantiveram-se próximos de zero até o 5º dia, devido ao período de adaptação (fase lag) das microalgas presentes no consórcio. A partir do 6º dia, observou-se um aumento gradativo na concentração de OD até o 16º dia de cultivo (fase exponencial de crescimento), em que as quantidades máximas de OD foram iguais 17,19, 17,88 e 15,94 mg L^{-1} para o branco e para as amostras fortificadas com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX, respectivamente. Por fim, no último dia de cultivo (20º dia) foi observado uma diminuição nas concentrações de OD para todos os testes, provavelmente devido à escassez de algum nutriente, visto que o cultivo não foi alimentado durante o período de cultivo.

Não houve diferença significativa nas concentrações de OD para os testes fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX, quando comparadas com os respectivos brancos ($p > 0,05$). As temperaturas do cultivo foram determinadas no momento da medição dos parâmetros OD e pH, na qual esses valores variaram entre 20,2-24,3 °C ao longo da batelada experimental.

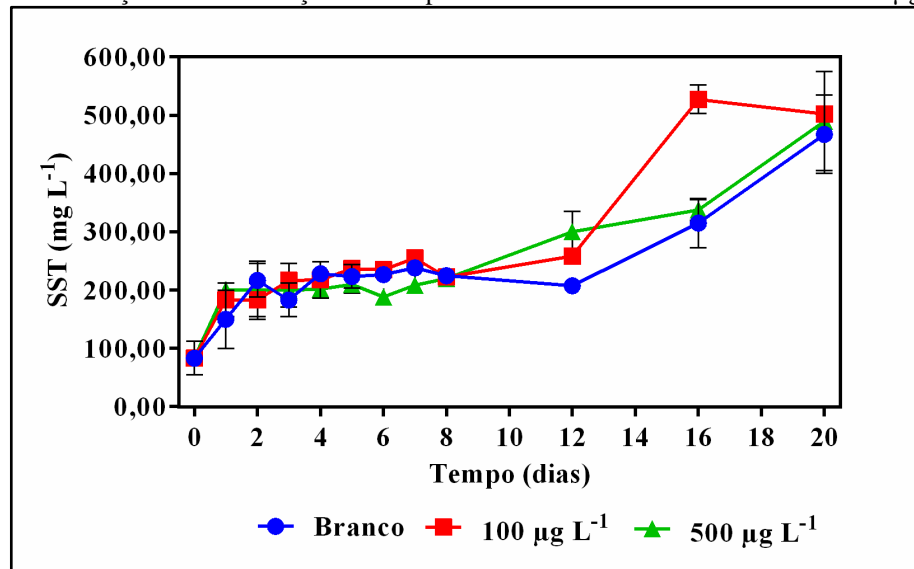
Os valores de pH aumentaram ligeiramente durante o período de cultivo, sendo observado um comportamento semelhante para os testes preliminares realizados (Figura 6.5b). Os valores de pH variaram entre 7,37-9,39, 7,42-9,53 e 7,47-9,39 para o branco e para os cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX, respectivamente, após 20 dias de cultivo. De acordo com Cai *et al.* (2013), os valores de pH estão diretamente relacionados com a concentração de CO_2 presente no meio. Portanto, o ligeiro aumento nos valores de pH durante o período de cultivo, sugere uma diminuição da quantidade de CO_2 , que acontece devido ao processo fotossintético realizado pelas microalgas autotróficas.

Figura 6.5 - Comportamento do consórcio microalgas-bactérias, referente às variáveis (a) OD e (b) pH, para os cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.



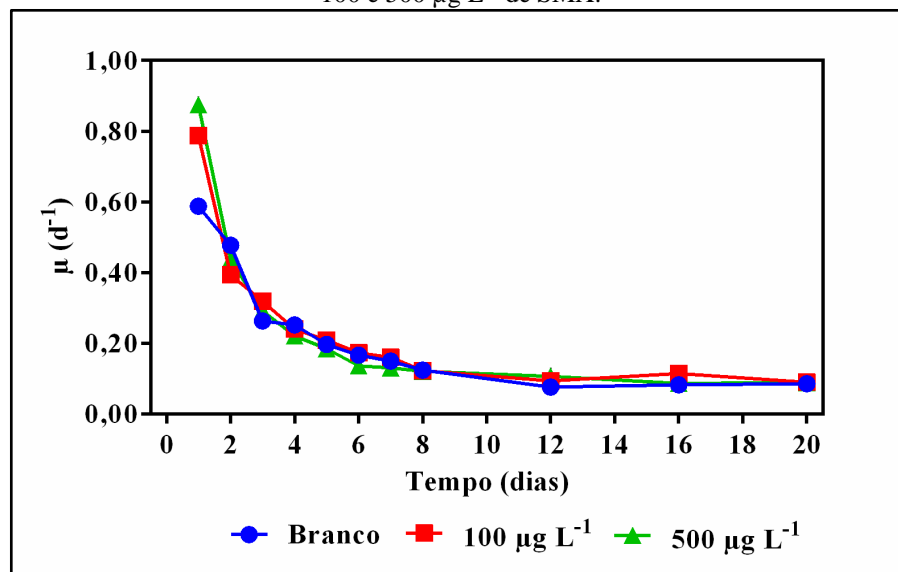
As análises de SST foram realizadas objetivando-se determinar a biomassa do consórcio microalgas-bactérias durante o período de cultivo. Observa-se na Figura 6.6, um ligeiro aumento na concentração de SST até o 12º dia, na qual as concentrações de SST foram iguais a 207,5, 258,3 e 300,0 mg L^{-1} para o branco e para os cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX, respectivamente. No entanto, a partir do 12º dia foi observado um aumento significativo nas concentrações de SST, com valores variando entre 467,5 e 502,5 mg L^{-1} (20º dia de cultivo). Portanto, as concentrações de SMX adicionadas não inibiram o crescimento do consórcio microalgas-bactérias. De acordo com Xiong *et al.* (2019b), concentrações $\leq 50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos antibióticos sulfametazina e SMX não inibiram significativamente o crescimento da biomassa microalgal da espécie *Scenedesmus obliquus*.

Figura 6.6 - Determinação da concentração de SST para os cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.



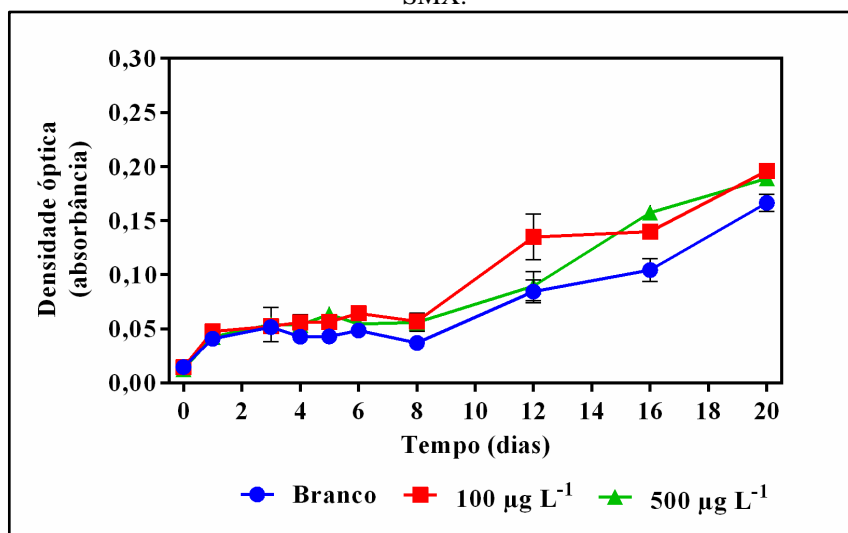
A taxa de crescimento específica (μ) do consórcio microalgas-bactérias foi determinada pela Equação 5.2. Após o período de cultivo, os valores de μ foram iguais a 0,086, 0,090 e 0,089 d^{-1} para o branco e para os cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX (Figura 6.7), respectivamente. Portanto, as concentrações de SMX adicionadas não inibiram o crescimento do consórcio microalgas-bactérias. Observa-se que os valores de μ vão diminuindo ao longo do cultivo. De acordo com Xiong *et al.* (2016b), a diminuição da taxa de crescimento pode ocorrer devido a diminuição da quantidade de nutrientes, e também devido ao aumento da concentração de OD no meio.

Figura 6.7 - Taxa de crescimento específica (μ) do consórcio microalgas-bactérias em cultivos fortificados com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.



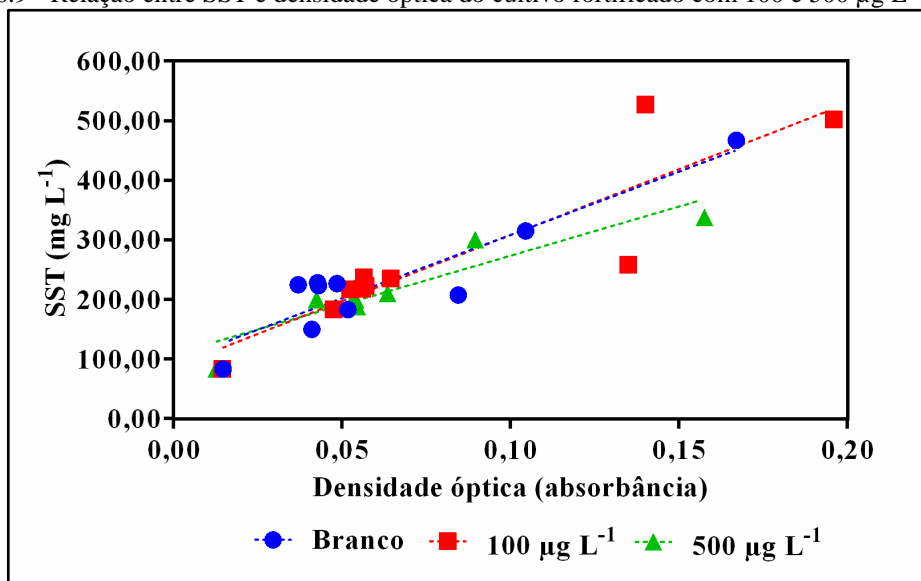
A densidade óptica dos cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias é diretamente proporcional à quantidade de Clo *a* presente nas células das microalgas. Analisando-se o gráfico apresentado na Figura 6.8, nota-se um aumento considerável de absorvância a partir do 8º dia de cultivo. Esses valores estão diretamente relacionados com as concentrações de OD e SST determinadas anteriormente. Logo, quanto maior a concentração de OD, maior será a biomassa microalgal, e conseqüentemente maior será a quantidade de Clo *a* presente nas microalgas do consórcio.

Figura 6.8 - Determinação da densidade óptica, $\lambda = 680 \text{ nm}$, do cultivo fortificado com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.



As análises de SST e de densidade óptica estão diretamente relacionadas com o crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias presentes nos fotobiorreatores. Portanto, construiu-se o gráfico SST *versus* densidade óptica (Figura 6.9) com o objetivo de avaliar o comportamento entre essas duas variáveis. Os valores de R^2 foram iguais a 0,84, 0,79 e 0,85 para o branco e para as amostras fortificadas com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX, respectivamente. Esses valores de R^2 obtidos no presente estudo podem ser justificados devido à complexidade existente entre os microrganismos presentes no consórcio microalgas-bactérias. Xiong *et al.* (2016b), obtiveram o valor de R^2 igual a 0,99 para a relação linear entre SST e densidade óptica. No entanto, esses autores avaliaram a remoção do antibiótico levofloxacina em meio de cultivo BBM utilizando monocultura de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris*.

Figura 6.9 - Relação entre SST e densidade óptica do cultivo fortificado com 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.



6.4 Efeito dos Antibióticos Selecionados no Crescimento do consórcio Microalgas-Bactérias

As bateladas experimentais foram fortificadas com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos antibióticos selecionados individualmente (SMX, TMP, CEF e ERI) e com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura formada entre TMP e SMX. O monitoramento do crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias foi determinado pelas análises de SST e Clo *a*, bem como pela medição diária da concentração de OD e pH no cultivo.

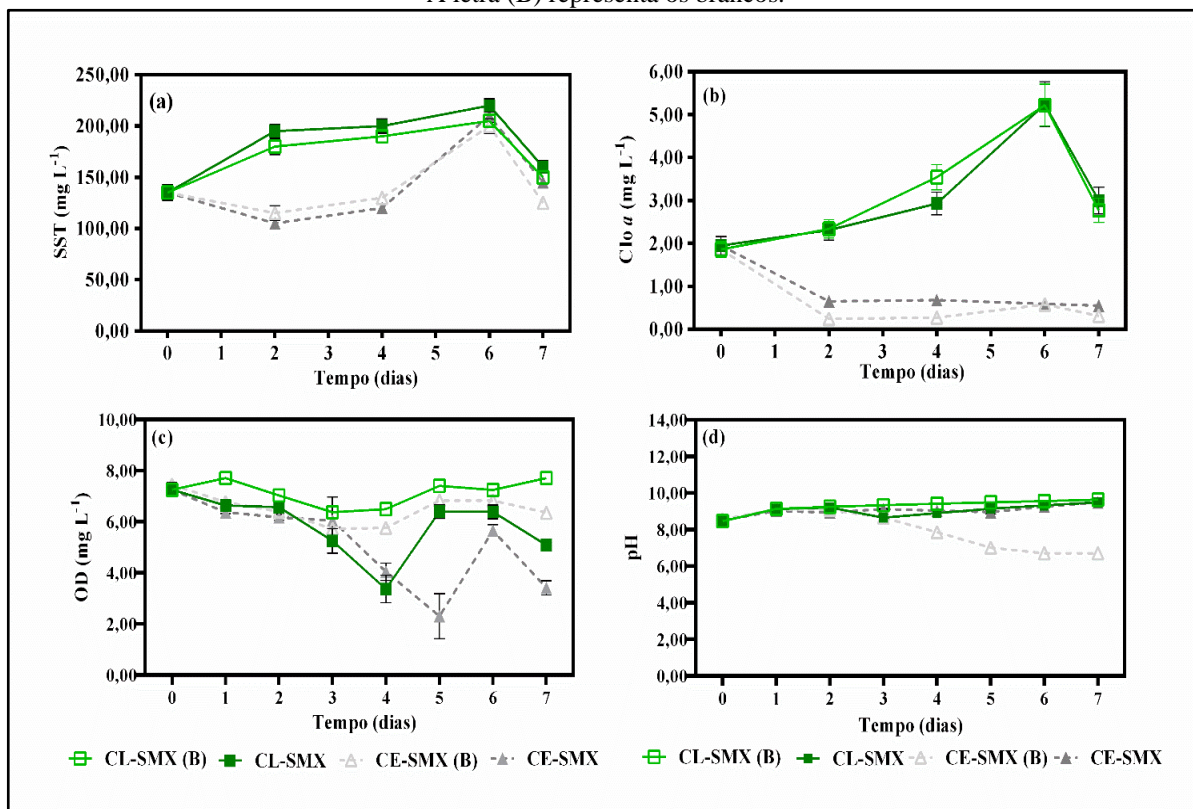
6.4.1 SMX

As concentrações de SST e Clo *a* para os cultivos fortificados com o SMX sob iluminação (CL-SMX) variaram entre 135,0 - 200,0 mg L^{-1} e 1,86,0 - 5,22 mg L^{-1} , respectivamente. As maiores concentrações de SST e Clo *a* foram obtidas no 6º dia de cultivo (Figuras 6.10a e 6.10b). Para os controles realizados no escuro a concentração de SST foi similar ao teste CL-SMX, no entanto não foi observado um aumento de Clo *a* durante o período de cultivo.

A concentração de OD no início do cultivo foi igual a 7,25 mg L^{-1} . Observou-se uma diminuição na concentração de OD até o 4 - 5º dia de cultivo, na qual a diminuição foi mais acentuada para os cultivos fortificados com o SMX. Os menores valores de OD foram iguais a 3,36 mg L^{-1} (CL-SMX) e 2,30 mg L^{-1} (CE-SMX), conforme apresentado na Figura 6.10c. O valor do pH no início do cultivo foi igual a 8,46. O branco realizado no escuro (CE-SMX (B))

apresentou uma ligeira diminuição no valor de pH a partir do 3º dia (Figura 6.10d). No entanto, foi observado aumento nos valores de pH para os experimentos realizados sob iluminação e para o teste CE-SMX. Os valores de pH variaram de 8,46 a 9,48.

Figura 6.10 - Avaliação do efeito do SMX no crescimento do consórcio microalgas-bactérias. (a) SST, (b) Clo *a* e (c) OD e (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.



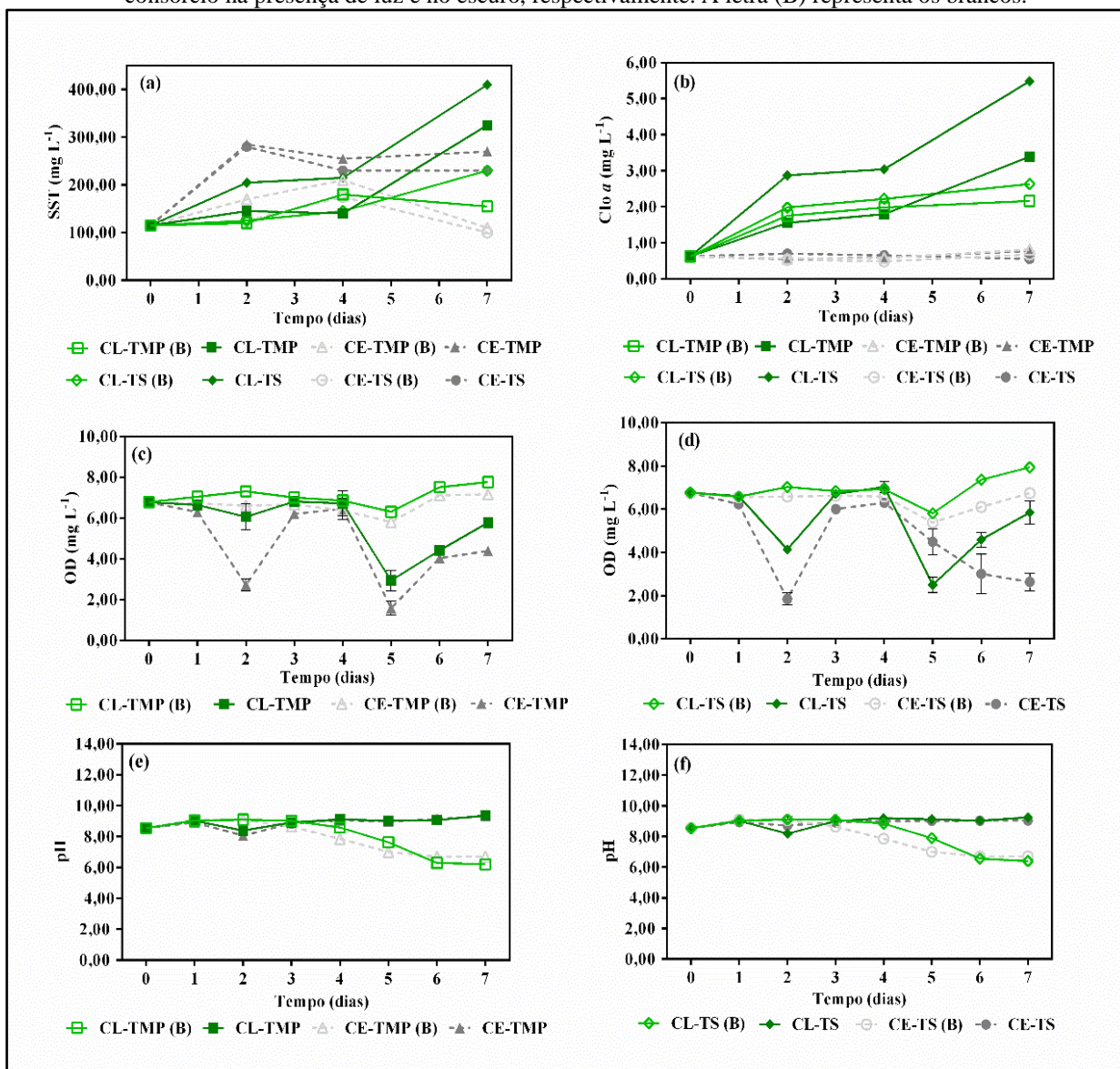
6.4.2 TMP e a mistura TMP/SMX

As concentrações de SST para os cultivos realizados sob iluminação com a TMP (CL-TMP) variaram entre 115,0 - 230,0 mg L⁻¹ e para os cultivos com a mistura TMP/SMX (CL-TS) as concentrações de SST variaram entre 115,0 - 410,0 mg L⁻¹ (CL-TS), durante sete dias de cultivo (Figura 6.11a). As concentrações de SST para os cultivos realizados no escuro, em geral, foram menores do que as concentrações dos testes realizados sob iluminação. Observou-se que a presença dos antibióticos proporcionou um aumento no teor de SST quando comparado aos respectivos brancos. As concentrações de Clo *a* variaram entre 0,62 - 3,39 mg L⁻¹ (CL-TMP) e 0,62 - 5,48 mg L⁻¹ (CL-TS), conforme apresentado na Figura 6.11b. As concentrações de Clo *a* para os controles realizados no escuro foram aproximadamente constantes ao longo do cultivo.

A quantidade inicial de OD no cultivo foi igual a 6,77 mg L⁻¹, sendo esse valor mantido aproximadamente constante até o 4º dia. No 5º dia foi observado uma diminuição na concentração

de OD (principalmente para o teste CL-TMP), em seguida o nível de OD aumentou ligeiramente (Figura 6.11c). Os cultivos fortificados com a mistura TMP/SMX apresentaram um comportamento similar, em termos de OD, quando comparado aos cultivos fortificados apenas com a TMP (Figura 6.11d). Os valores de pH variaram de 6,21 a 9,36 para os experimentos realizados com a TMP (Figura 6.11e) e de 6,40 a 9,10 (Figura 6.11f) para os experimentos feitos com a mistura TMP/SMX. Observou-se aumento nos valores de pH para os cultivos fortificados com os antibióticos. Entretanto, os valores de pH diminuíram continuamente, a partir do 3º dia de cultivo, para os brancos realizados na presença e na ausência de luz.

Figura 6.11 - Avaliação do efeito da TMP e da mistura TMP/SMX no crescimento do consórcio microalgas-bactérias. (a) SST, (b) Clo *a* e (c) OD (batelada com a TMP), (d) OD (batelada com a mistura TMP/SMX), (e) pH (batelada com a TMP) e (f) pH (batelada com a mistura TMP/SMX). As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.

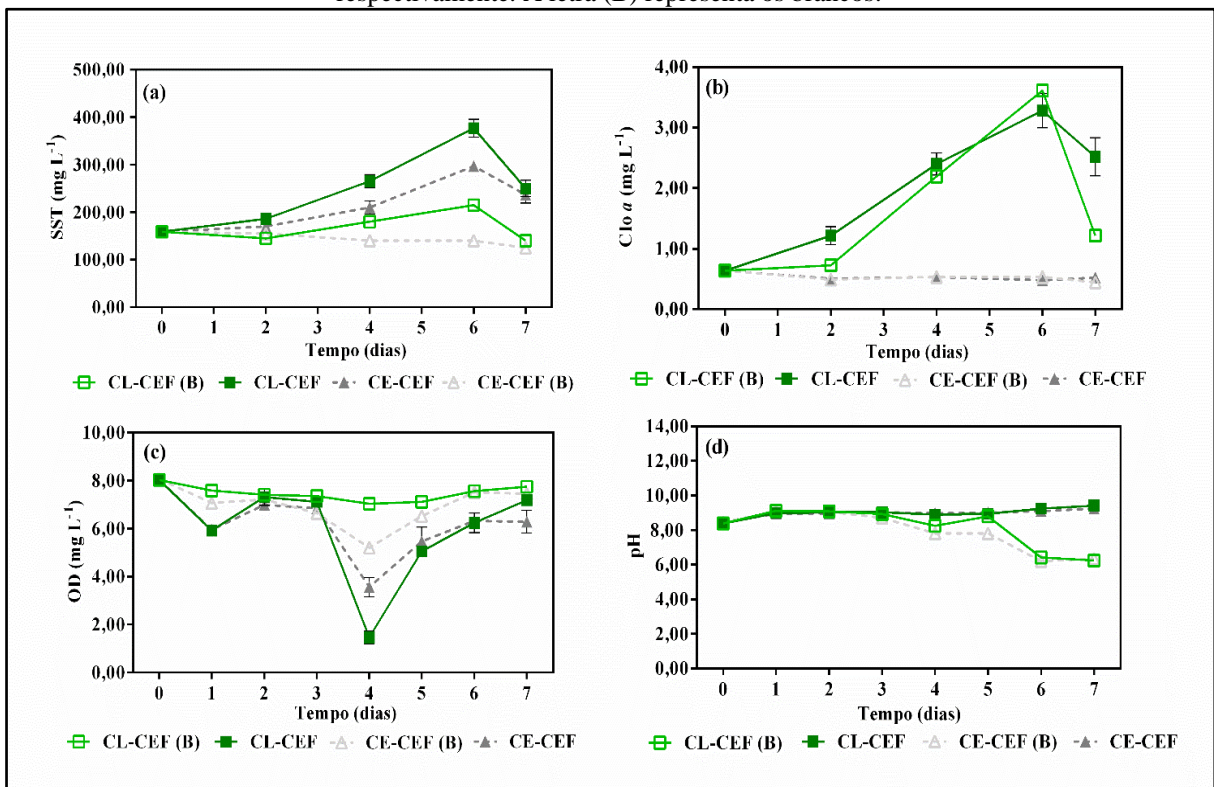


6.4.3 CEF

Os cultivos realizados sob iluminação com a CEF (CL-CEF) apresentaram concentrações de SST e Clo *a* variando entre 159,0 - 376,7 mg L⁻¹ e 0,63 - 3,27 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 6.12a e 6.12b). Para os controles realizados no escuro as concentrações de SST foram similares, no entanto não foi observado aumento na concentração de Clo *a* durante os sete dias de cultivo.

A concentração inicial de OD foi igual a 8,02 mg L⁻¹. Foi observado uma diminuição na concentração de OD no 4º dia cultivo, principalmente, para o teste CL-CEF (Figura 6.12c). Os valores de pH aumentaram ligeiramente na presença da CEF tanto para o cultivo realizado na presença quanto na ausência de luz. No entanto, a partir do 3º dia de cultivo foi observado uma diminuição nos valores de pH para os respectivos brancos. Os valores de pH variaram entre 8,38 - 9,41 (Figura 6.12d) para o experimento CL-CEF.

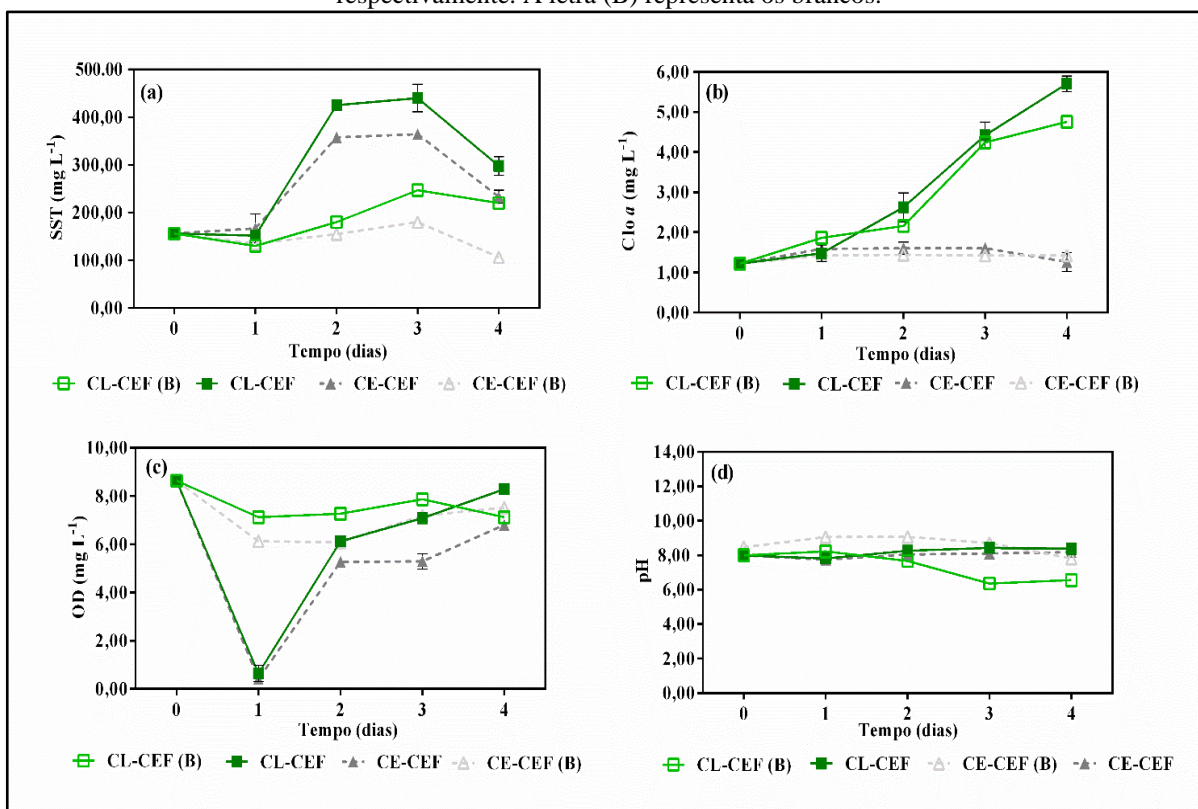
Figura 6.12 - Avaliação do efeito da CEF no crescimento do consórcio microalgas-bactérias durante sete dias. (a) SST, (b) Clo *a* e (c) OD (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.



A CEF foi removida rapidamente nos cultivos como será visto à frente, sendo assim uma nova batelada experimental com esse antibiótico foi realizada por um período de quatro dias. As concentrações de SST para os testes CL-CEF variaram entre 151,7 - 440,0 mg L⁻¹ (Figura 6.13a) e os teores de Clo *a* variaram entre 1,22 - 5,70 mg L⁻¹ (Figura 6.13b).

A quantidade inicial de OD foi igual a 8,63 mg L⁻¹. Após o 1º dia, observou-se uma diminuição ab-rupta na concentração de OD para os cultivos fortificados a CEF (Figura 6.13c). Em seguida, foi observado um aumento na quantidade de OD até o último dia de cultivo. O valor inicial do pH no cultivo foi igual a 7,98. Os valores de pH para os cultivos fortificados com a CEF sob iluminação (CL-CEF) variaram entre 7,98 - 8,42. Na Figura 6.13d é apresentado o comportamento do pH durante o período de cultivo.

Figura 6.13 - Avaliação do efeito da CEF no crescimento do consórcio microalgas-bactérias durante quatro dias. (a) SST, (b) Clo *a* e (c) OD (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.



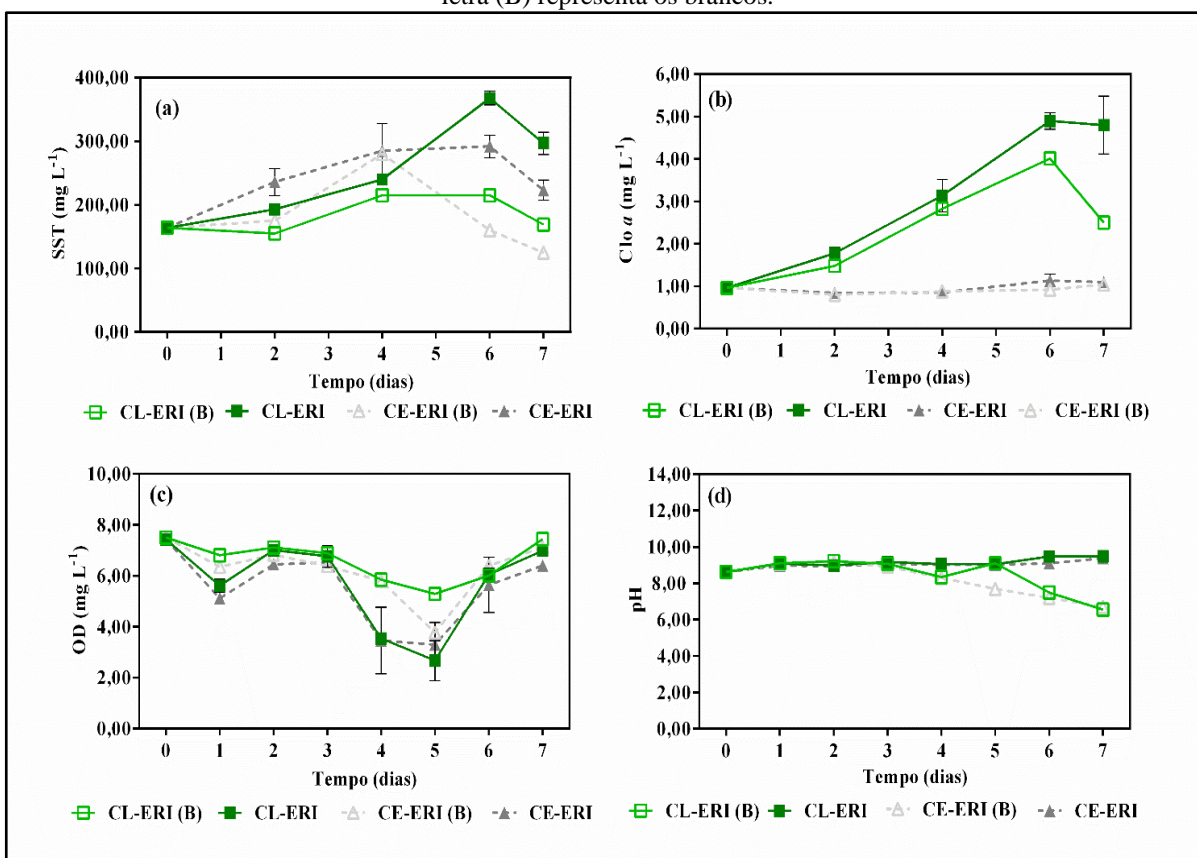
6.4.4 ERI

As concentrações de SST para os cultivos realizados sob iluminação fortificados com a ERI (CL-ERI) variaram entre 164,0 - 368,0 mg L⁻¹ (Figura 6.14a). As concentrações de SST foram maiores para os cultivos contendo a ERI quando comparado aos respectivos brancos. Os teores de Clo *a* variaram de 0,96 a 4,90 mg L⁻¹, no entanto, para os controles realizados no escuro não foi observado variação na concentração de Clo *a* durante o período de cultivo (Figura 6.14b).

A concentração inicial de OD foi igual a 7,43 mg L⁻¹. Na Figura 6.14c observa-se comportamento similar, em termos de OD, para os cultivos realizados. No entanto, houve uma

queda mais acentuada na concentração de OD, entre o 4º e o 5º dia, para os cultivos na presença da ERI. O valor inicial de pH do cultivo foi igual a 8,61. Esse valor aumentou ligeiramente para os cultivos fortificados com a ERI (CL-ERI e CE-ERI), conforme apresentado na Figura 6.14d. Para o teste CL-ERI os valores de pH variaram entre 8,61 - 9,49. Os brancos apresentaram uma diminuição nos valores de pH, a partir do 3º dia (CE-ERI (B)) e 5º dia (CL-ERI (B)) de cultivo.

Figura 6.14 - Avaliação do efeito da ERI no crescimento do consórcio microalgas-bactérias. (a) SST, (b) Clo *a* e (c) OD (d) pH. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.



6.4.5 Avaliação geral do crescimento do consórcio microalgas-bactérias na presença dos antibióticos selecionados

Analisando-se as bateladas experimentais, anteriormente descritas, foi observado um aumento na biomassa do consórcio microalgas-bactérias, em termos de SST, tanto para os testes realizados sob iluminação LED quanto para os testes realizados no escuro. Para todos os experimentos a biomassa do consórcio microalgas-bactérias foi maior para os cultivos sob iluminação LED, fortificados com 50 µg L⁻¹ do antibiótico selecionado. Esse resultado está diretamente associado ao crescimento autotrófico das microalgas, comprovadamente demonstrado pelo aumento da concentração de Clo *a* nos experimentos. A principal espécie de

microalgas identificada no consórcio (*Chlorella sorokiniana*) cresce autotroficamente, conforme descrito na seção 6.2.

De forma geral, foi observado maiores valores nas concentrações de Clo *a* para os cultivos na qual os antibióticos foram adicionados, sugerindo uma possível inibição ou inativação de bactérias que por ventura competiam com as microalgas no cultivo. De acordo com Gonçalves *et al.* (2017) pode acontecer interações competitivas entre algumas espécies de microalgas e bactérias, como efeitos adversos de um sobre o outro, como por exemplo a excreção de substâncias algicidas ou bactericidas. O aumento na biomassa do consórcio microalgas-bactérias pode ter ocorrido pela metabolização dos antibióticos, na qual os metabolitos gerados estimularam o crescimento das microalgas. Todavia, estudos adicionais são necessários para se compreender melhor a complexidade do crescimento do consórcio na presença dos antibióticos selecionados (Liu *et al.*, 2017; Leng *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019).

Em geral, os experimentos realizados no escuro apresentaram maiores concentrações de SST para os cultivos fortificados com os antibióticos quando comparado aos respectivos brancos. Este resultado pode estar associado à inibição ou inativação de algumas espécies específicas de bactérias. O aumento nas concentrações de SST ocorre devido a atividade heterotrófica realizada pelos microrganismos presentes no consórcio.

O crescimento do consórcio microalgas-bactérias é afetado por diversos fatores: iluminação, intensidade luminosa, temperatura, CO₂, OD, pH, entre outros (Norvill *et al.*, 2016). Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a adição de 50 µg L⁻¹ de cada antibiótico selecionado (SMX, TMP, TMP/SMX, CEF e ERI) não inibiram o crescimento do consórcio microalgas-bactérias, mas sim foram responsáveis por aumentar a biomassa do consórcio, em termos de SST e Clo *a*, durante o período de cultivo. Provavelmente, a presença de um antibiótico específico foi capaz de inibir ou inativar o crescimento de algumas espécies de bactérias predominantes no cultivo, facilitando o crescimento das microalgas.

Em relação as principais bactérias encontradas no inóculo temos que as *Brevundimonas sp.* podem ser resistentes a diferentes classes de antibióticos, incluindo β-lactâmicos e fluoroquinolonas (Ryan e Pembroke, 2018). *Burkholderia cepacia* e espécies correlatas foram associadas à resistência intrínseca a múltiplos antibióticos, relacionada à diminuição da permeabilidade da membrana externa, alterações nos alvos de antibióticos, integrons e principalmente bombas de efluxo ativo (Tseng *et al.*, 2014). *Stenotrophomonas maltophilia* é uma bactéria ambiental encontrada em habitats aquosos, essa bactéria é considerada um patógeno e exibe resistência a uma ampla gama de antibióticos. A baixa permeabilidade da membrana que contribui para a resistência a β-lactâmicos e a presença de bombas de efluxo de resistência a

múltiplas drogas codificadas cromossomicamente, β -lactamases e enzimas modificadoras de antibióticos contribuem para a resistência intrínseca aos antibióticos de *S. Maltophilia* (Brooke, 2012). As espécies de *Bosea sp.* foram reconhecidas como bactérias multirresistentes a antibióticos (Falcone-Dias *et al.*, 2012).

As microalgas apresentam boa resistência à antibióticos quando comparado às bactérias. Geralmente, os antibióticos são detectados em baixas concentrações nos efluentes de ETEs (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) e os valores de EC_{50} das microalgas encontram-se na ordem de mg L^{-1} (Leng *et al.*, 2019). Esses mesmos autores, afirmam que condições favoráveis de crescimento do consórcio microalgas-bactérias favorecem a remoção de antibióticos. Especificamente para os testes CL-TS e CL-CEF foi observado um aumento significativo nas concentrações de SST quando comparado aos respectivos brancos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 6.1.

As taxas de crescimento específica (μ) do consórcio microalgas-bactérias foram maiores para os cultivos realizados na presença dos antibióticos. Além disso, os testes realizados no escuro apresentaram menores valores de μ quando comparados com os testes realizados sob iluminação (Tabela 6.1). Esse resultado indica à inibição da atividade fotossintética realizada pelas microalgas autotróficas.

O decréscimo na concentração de Clo *a* no último dia de cultivo para as bateladas experimentais realizadas por sete dias, provavelmente ocorreu devido à limitação de algum nutriente ou excesso de subprodutos tóxicos no meio, visto que os fotobiorreatores não foram alimentados durante o período de cultivo. As concentrações de Clo *a* não foram significativamente influenciadas pela adição de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos antibióticos SMX, TMP, TMP/SMX e ERI no cultivo quando comparado aos respectivos brancos. No entanto, a concentração de Clo *a* foi significativamente maior para o teste CL-CEF quando comparada com o respectivo branco ($p < 0,05$) (Tabela 6.1). É importante destacar que as quantidades iniciais de Clo *a* foram iguais a $1,91 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$, $0,62 \pm 0,0082 \text{ mg L}^{-1}$, $0,58 \pm 0,092 \text{ mg L}^{-1}$, $1,22 \pm 0,017 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,96 \pm 0,12 \text{ mg L}^{-1}$ para os cultivos realizados com SMX, TMP/SMX, CEF (7 e 4 dias) e ERI, respectivamente.

Tabela 6.1 - *p*-valores para as análises de SST e Clo *a* e os valores da taxa de crescimento específica (μ) da biomassa do consórcio microalgas-bactérias.

Experimentos	SST <i>p</i>-valor	μ (d⁻¹)	Clo <i>a</i> <i>p</i>-valor
CL-SMX		0,070	
CL- SMX (B)	> 0,05	0,060	> 0,05
CE-SMX		0,063	
CE-SMX (B)	> 0,05	0,056	> 0,05
CL-TMP		0,13	
CL- TMP (B)	> 0,05	0,037	> 0,05
CE-TMP		0,11	
CE- TMP (B)	> 0,05	-0,0056	> 0,05
CL-TS		0,16	
CL- TS (B)	< 0,05	0,16	> 0,05
CE-TS		0,087	
CE- TS (B)	> 0,05	0,020	> 0,05
CL-CEF*		0,26	
CL- CEF (B)	< 0,05	0,11	< 0,05
CE-CEF		0,21	
CE- CEF (B)	< 0,05	0,036	> 0,05
CL-ERI		0,12	
CL-ERI (B)	> 0,05	0,04	> 0,05
CE-ERI		0,08	
CE-ERI (B)	> 0,05	-0,004	> 0,05

* Cultivo realizado por quatro dias.

Xiong *et al.* (2019b) avaliaram o crescimento da espécie de microalgas *Scenedesmus obliquus* sob diferentes concentrações dos antibióticos sulfametazina e SMX. Foi observado que concentrações $\leq 50 \mu\text{g L}^{-1}$ de ambos antibióticos não inibiram significativamente o crescimento da biomassa microalgal. No entanto, foi observado uma inibição de 73,44% no crescimento em concentrações de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos referidos antibióticos quando comparado aos brancos. Portanto, os resultados obtidos na presente pesquisa são compatíveis com os resultados obtidos por esses autores.

Pomati *et al.* (2004) avaliaram a influência de concentrações distintas de ERI no crescimento da cianobactéria *Synechocystis sp.* e da lentilha d'água *Lemma minor* cultivadas em meio de cultura BG-11 esterilizado. Os cultivos foram realizados a 26 °C e pH = 7 por um período de sete dias. Os resultados obtidos por esses autores mostram que concentrações de 1000 µg L⁻¹ inibiram o crescimento em 70 e 20% para os respectivos microrganismos. Por outro lado, concentrações de 10 µg L⁻¹ da ERI foram responsáveis por promover um crescimento médio de 20% desses microrganismos. Os autores sugerem que a ERI tenha sido metabolizada pelos microrganismos e que os metabólitos gerados podem estimular o crescimento dessas cianobactérias. No entanto, os autores afirmam que uma investigação aprofundada é necessária.

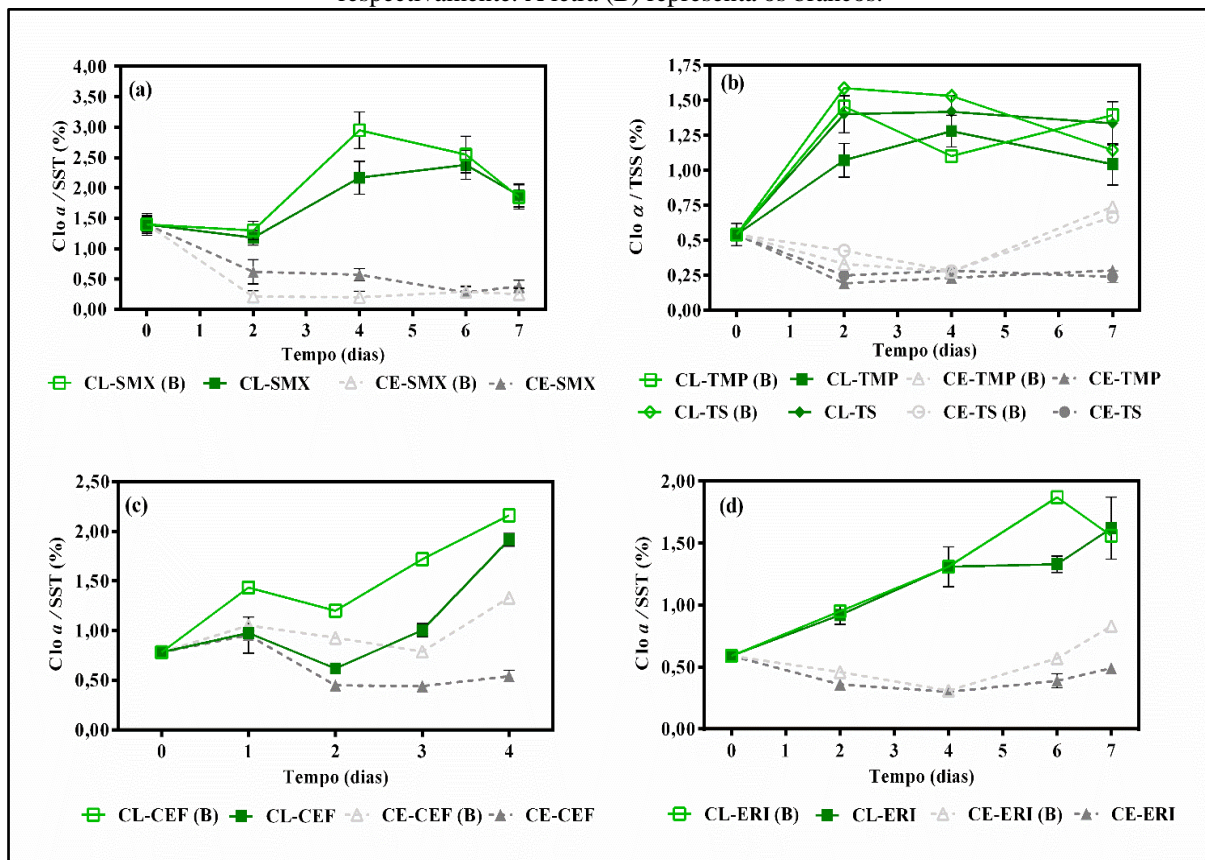
De acordo com Xiong *et al.* (2016a) o aumento no teor de clorofila nas células de microalgas pode ser explicado pelo fato de a clorofila atuar como um agente protetor para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são formadas sob condições de estresse, tais como: luz, temperatura, pH, salinidade e exposição a poluentes tóxicos. Portanto, os MPEs, incluindo os antibióticos, podem ser responsáveis por induzir a superprodução e o acúmulo de ROS (O₂⁻, H₂O₂ e ¹O₂) (Paliwal *et al.*, 2015). Essas espécies reativas nas microalgas possuem fortes potenciais de oxidação, o que pode causar danos letais às organelas celulares (Kurade *et al.*, 2019). Portanto, além do aumento de pigmentos fotossintéticos, como a Clo *a*, carotenoides, características bioquímicas e enzimas antioxidantes podem servir como um sistema defensivo para eliminar as ROS acumuladas no cloroplasto das microalgas (Xiong *et al.*, 2016a).

Kurade *et al.* (2019) estudaram a influência de concentrações do antibiótico SMX (0,05 -1,00 mg L⁻¹) na quantidade de Clo *a* da planta semiaquática *Ipomoea aquatic* cultivadas em meio de cultura. Esses autores, concluíram que as concentrações de SMX avaliadas não afetaram significativamente o crescimento da biomassa da planta utilizada. Os resultados obtidos no presente estudo são similares aos encontrados por esses autores.

Observou-se uma correlação positiva entre as análises de SST e Clo *a* para os cultivos realizados sob iluminação LED de baixa intensidade, na qual os valores do coeficiente de correlação de Pearson (*r*) foram iguais a 0,713 (CL-SMX), 0,946 (CL-TMP), 0,976 (CL-TS), 0,949 (CL-CEF), 0,953 (CL-ERI). Esse resultado indica uma relação direta entre as concentrações de Clo *a* e SST. Todavia, para os controles realizados no escuro as concentrações de Clo *a* não aumentaram durante o período de cultivo, pois a ausência de luz foi responsável por prejudicar a atividade fotossintética realizada pelas microalgas autotróficas presentes no consórcio.

As razões Clo *a*/SST dos cultivos fortificados com os antibióticos selecionados são apresentadas na Figura 6.15. Os testes realizados sob iluminação LED apresentaram razões Clo *a*/SST maiores do que 1%, indicando um crescimento saudável do consórcio microalgas-bactérias (Veloso *et al.*, 1991). No entanto, o mesmo não foi observado para os controles realizados no escuro, na qual as razões Clo *a*/SST foram menores do que 1%, indicando um comprometimento na fotossíntese realizada pelas microalgas autotróficas, devido à ausência de luz no cultivo.

Figura 6.15 - Avaliação da razão Clo *a*/SST para as bateladas experimentais realizadas com (a) SMX, (b) TMP e TMP/SMX, (c) CEF e (d) ERI. As siglas CL e CE referem-se ao consórcio na presença de luz e no escuro, respectivamente. A letra (B) representa os brancos.



A diminuição nas concentrações de OD observada nos cultivos ocorre devido à respiração de bactérias heterotróficas. Consequentemente, o CO₂ liberado por essas bactérias é utilizado pelas microalgas autotróficas na fotossíntese, sendo observado um aumento na concentração de O₂ no cultivo. Logo a simbiose existente entre as microalgas e bactérias são responsáveis pelo aumento da biomassa do consórcio (Eio *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Quijano *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018). O crescimento da biomassa é estimulado pelo CO₂ liberado pelas bactérias aeróbias

heterotróficas, que ocorre pela degradação da matéria orgânica presente no meio, e possivelmente pela biodegradação dos antibióticos presentes no cultivo.

A diminuição nos valores de pH pode ser explicada devido à liberação de CO₂ no cultivo pelas bactérias aeróbias heterotróficas (Gonçalves *et al.*, 2017). De acordo com Wang e Wang (2018a) o pH do meio afeta a solubilidade e o estado iônico do contaminante orgânico, além de influenciar na fisiologia dos microrganismos presentes no cultivo. Os valores de pK_a para os antibióticos selecionados são iguais a: SMX (1,6 e 5,7), 7,12 (TMP), 3,5 e 7,4 (CEF) e 8,9 (ERI), conforme pode ser observado na Tabela 3.2, apresentada anteriormente na seção 3.2.1. De forma geral, os cultivos realizados sob iluminação na presença dos antibióticos selecionados apresentaram valores de pH ligeiramente alcalinos, indicando que os antibióticos SMX e CEF encontram-se predominantemente na forma aniônica, enquanto a espécie neutra é predominante para os antibióticos TMP e ERI. Segundo Qi *et al.* (2014) as formas aniônicas das substâncias orgânicas são mais facilmente degradadas quando comparadas as respectivas formas moleculares nos processos oxidativos avançados.

Wang e Wang (2018b) em seus estudos mostram que a bactéria *Acinetobacter sp.* foi capaz de degradar o SMX em condições neutras ou alcalinas, mas em condições ácidas a degradação é insignificante. Bai e Acharya (2017) afirmaram que a TMP e o SMX encontram-se na forma mais estável quando o pH é ligeiramente básico, indicando que a hidrólise pode ser desconsiderada nessas condições. Além disso, o pH pode influenciar na composição de consórcios de microrganismos, afetando diretamente na degradação desses antibióticos.

As determinações de SST e Clo *a* juntamente com o monitoramento diário dos parâmetros OD e pH são importantes para avaliar o crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias ao longo do cultivo. Portanto, as análises realizadas indicam uma relação simbiótica existente entre as microalgas e bactérias presentes no consórcio, assim como relatado anteriormente na literatura (Eio *et al.*, 2015; Ramanan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

6.5 Determinação de Nutrientes (N e P) e Carbono Orgânico Total (COT)

Os macronutrientes N e P juntamente com o teor de COT foram determinados apenas para as duas últimas bateladas experimentais realizadas, na qual os cultivos foram fortificados com CEF e ERI. Essas análises foram realizadas com a intenção de verificar o comportamento dos elementos N, P e C ao longo do cultivo.

6.5.1 CEF (batelada experimental de 4 dias)

O N inorgânico disponível para o consórcio microalgas-bactérias encontra-se predominantemente como N amoniacal, na qual a concentração inicial de N-NH_4^+ foi igual a $47,29 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 6.2). A remoção de N-NH_4^+ para os testes sob iluminação foi de 72,36% (CL-CEF (B)) e 65,62% (CL-CEF). Para os controles realizados no escuro a remoção de N-NH_4^+ foi de 80,27% (CE-CEF (B)) e 51,81% (CE-CEF), após quatro dias de cultivo. O N inorgânico na forma de N-NH_4^+ é preferencialmente assimilado pelas microalgas, inclusive para a *Chlorella sorokiniana* que é a espécie de microalgas predominante no consórcio (Ramsundar *et al.*, 2017). A diminuição do N-NH_4^+ também pode ocorrer por bactérias nitrificantes presentes no consórcio. No entanto, a concentração de CEF pode ter inibido ou inativado algumas bactérias nitrificantes, resultando em uma menor diminuição do N-NH_4^+ quando comparado aos brancos.

A concentração inicial de N-NO_3^- foi igual a $4,45 \text{ mg L}^{-1}$. Após o período de cultivo a concentração de N-NO_3^- foi igual a $9,87 \text{ mg L}^{-1}$ para o teste CL-CEF (B), ou seja aproximadamente 2,2 maior em relação a concentração inicial. Por outro lado, no teste CL-CEF foi observado uma remoção de 64,94% de N-NO_3^- . Para os controles realizados no escuro, a concentração de N-NO_3^- foi cerca de 2,7 vezes maior (CE-CEF (B)), enquanto para o teste CE-CEF observou-se uma remoção de N-NO_3^- igual a 82,70%. Portanto, o aumento na concentração de N-NO_3^- para os brancos (experimentos realizados sem a adição da CEF), pode ser justificado pela ação de bactérias nitrificantes, que oxidam a amônia em nitrato (Courstens *et al.*, 2016). E no caso dos cultivos em que foi adicionado a CEF pode ter ocorrido a inibição ou inativação destas bactérias nitrificantes, uma vez que a CEF é um agente bactericida.

Suarez *et al.* (2010) avaliaram a remoção de 16 PPCPs em fotobiorreatores aeróbios contendo bactérias nitrificantes e em fotobiorreatores anaeróbios contendo bactérias desnitrificantes. Os resultados obtidos mostram que as bactérias nitrificantes foram mais eficientes na degradação dos PPCPs analisados quando comparado às bactérias desnitrificantes.

A concentração inicial de P-PO_4^{3-} no cultivo foi igual a $7,76 \text{ mg L}^{-1}$. Observou-se uma remoção de P-PO_4^{3-} igual a 89,43% (CL-CEF (B)), 92,40% (CL-CEF), 91,62% (CE-CEF (B)) e 93,30% (CE-CEF), após quatro dias de cultivo (Tabela 6.2). O P é um elemento essencial para o metabolismo dos microrganismos, logo a sua ausência influencia diretamente no crescimento da biomassa do consórcio microalgas-bactérias.

A concentração inicial de carbono inorgânico (CI) foi igual a $42,90 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 6.2). Foi observado, no último dia de cultivo, uma diminuição na concentração de CI de 97,20%

(CL-CEF (B)) e 46,39% (CL-CEF), 97,06% (CE-CEF (B)) e 38,87% (CE-CEF). Observa-se uma maior redução na concentração de CI para os brancos realizados na presença e na ausência de iluminação. Para os experimentos sob iluminação LED o consumo do CI deve-se a utilização de CO₂ no processo fotossintético realizado pelas microalgas autotróficas e também pelas bactérias nitrificantes. O consumo de CI para os experimentos realizados no escuro pode ter ocorrido pela atividade heterotrófica de microalgas e bactérias, e também pelas bactérias nitrificantes. No entanto, mais estudos são necessários para compreender a influência de 50 µg L⁻¹ de CEF na redução do consumo de CI, uma vez que a concentração adicionada desse antibiótico não inibiu o crescimento das microalgas.

A concentração inicial de COT foi igual a 15,18 mg L⁻¹. Depois de dois dias foi observado um aumento na concentração de COT variando entre 9,96-15,90%, exceto para o experimento CL-CEF, na qual foi observado um aumento de 43,96%. O aumento na concentração de COT ocorreu, possivelmente, devido à liberação de metabolitos secundários no cultivo ou da morte celular em resposta a adaptação da biomassa. Observou-se uma diminuição de COT de 20,88% para o branco CL-CEF (B), enquanto para o experimento CL-CEF a concentração de COT aumentou em 11,20%. Resultados similares foram obtidos para o controle realizado no escuro, pois houve uma diminuição na concentração de COT de 30,53% para o branco CE-CEF (B) e um aumento na concentração de COT de 21,85% para o experimento CE-CEF. Sugere-se que a redução na concentração de COT tenha ocorrido devido à atividade heterotrófica realizada por microalgas e bactérias

Tabela 6.2 - Determinação de nutrientes (N e P) e carbono total para a batelada experimental com a CEF durante 4 dias de cultivo. Na qual CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio realizados na presença e na ausência de luz, respectivamente, (B) representam os brancos.

Dias de cultivo	Amostras	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	P-PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	TOC (mg L ⁻¹)	TC (mg L ⁻¹)	IC (mg L ⁻¹)
0	Início do cultivo	47,29	4,45	7,76	15,18	58,07	42,89
2	CL-CEF (B)	17,03	6,59	6,26	18,05	28,07	10,02
4	CL-CEF (B)	13,07	9,87	0,82	12,01	13,21	1,20
2	CL-CEF	16,72	0,65	1,40	27,09	51,97	24,88
4	CL-CEF	16,26	1,56	0,59	17,12	40,11	22,99
2	CE-CEF (B)	11,36	2,71	1,34	17,84	37,22	19,38
4	CE-CEF (B)	9,33	11,99	0,65	8,79	10,05	1,26
2	CE-CEF	23,57	5,55	5,67	16,86	40,99	24,13
4	CE-CEF	22,79	0,77	0,52	19,43	45,65	26,22

6.5.2 ERI (batelada experimental de 7 dias)

A concentração de N-NH₄⁺ no efluente da ETE e no início do cultivo foi igual a 57,71 e 51,80 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 6.3). Foi observado uma diminuição na concentração de N-NH₄⁺ de 65,46% para o branco cultivado sob iluminação (CL-ERI (B)), enquanto para o experimento CL-ERI a concentração de N-NH₄⁺ foi cerca de 2,5 vezes maior em relação a concentração inicial do cultivo. Resultados similares, em termos N-NH₄⁺, foram observados para os controles realizados no escuro, na qual a concentração de N-NH₄⁺ diminuiu 42,2% para o branco CE-ERI (B) e aumentou 2,6 vezes para o experimento CE-ERI. Sugere-se que a redução na concentração de N-NH₄⁺ para os brancos realizados na presença e na ausência de luz tenha ocorrido pela atividade das microalgas e também pelas bactérias nitrificantes presentes no cultivo. O aumento na concentração de NH₄⁺ para os testes fortificados com 50 µg L⁻¹ de ERI (CL-ERI e CE-ERI) pode ter ocorrido pelo processo denominado de amonificação, devido a morte celular. De acordo com Simsek *et al.* (2016), espécies específicas de bactérias podem liberar enzimas que decompõe o N orgânico em amônia.

A concentração de N-NO₃⁻ diminuiu 6,02% para o branco CL-ERI (B) e 90,51% para o experimento CL-ERI. Resultados similares foram obtidos para os controles realizados no escuro, na qual a concentração de N-NO₃⁻ diminuiu 13,06% (CE-ERI (B)) e 90,41% (CE-ERI). Logo, para os cultivos fortificados com 50 µg L⁻¹ de ERI na presença ou na ausência de luz, o N foi consumido preferencialmente na forma de N-NO₃⁻ pelos microrganismos presentes no

consórcio microalgas-bactérias. Além disso, foi observado um considerável aumento na concentração de N-NH_4^+ para esses cultivos em relação a concentração inicial.

A concentração inicial de P-PO_4^{3-} foi igual a 4,99 e 6,20 mg L^{-1} para o efluente da ETE e para o início do cultivo, respectivamente. A assimilação de P-PO_4^{3-} foi igual a 6,61% (CL-ERI (B)), 28,87% (CL-ERI), 14,52% (CE-ERI (B)) e 23,71% (CE-ERI). Sendo assim, a adição de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ERI propiciou uma maior assimilação de P-PO_4^{3-} , devido à inativação ou inibição de algumas bactérias que competiam por esse nutriente, o que vai de encontro com os maiores valores de biomassa (maiores concentrações de SST e Clo *a*) para os experimentos realizados sob iluminação LED.

A concentração inicial de CI foi igual a 49,91 e 58,25 mg L^{-1} para o efluente da ETE e para o início do cultivo, respectivamente (Tabela 6.3). Observa-se uma diminuição de 95,4% na concentração de CI para o teste CL-ERI (B), indicando o consumo de CO_2 pela fotossíntese realizada pelas microalgas e também pela presença de bactérias nitrificantes no cultivo. Além disso, o crescimento heterotrófico das microalgas pode ter ocorrido, uma vez que a concentração de COT diminuiu em 36,8%. No entanto, a concentração de CI aumentou 1,6 vezes para o experimento CL-ERI quando comparado à concentração inicial do cultivo. Enquanto a concentração de COT permaneceu praticamente constante. Este fato, sugere a predominância de microrganismos heterotróficos no meio, devido à liberação de CO_2 . Similarmente ao ocorrido para o branco sob iluminação foi observado para o branco realizado no escuro, pois tanto a concentração de CI quanto a de COT diminuíram para o teste CE-ERI (B), indicando o crescimento heterotrófico dos microrganismos, além da atividade nitrificante de bactérias específicas. Para o cultivo com a adição de CEF (CE-ERI), a concentração de COT não foi significativamente alterada, enquanto a concentração de CI aumentou cerca de 1,8 vezes, sugerindo o crescimento heterotrófico no cultivo.

Tabela 6.3 - Determinação de nutrientes (N e P) e carbono total para a batelada experimental com a ERI. Na qual CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio realizados na presença e na ausência de luz, respectivamente, e (B) representam os brancos.

Dias de cultivo	Amostras	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	P-PO ₄ ³⁻	COT	CI	CT
0	Efluente da ETE	57,71	3,29	4,99	29,05	49,91	78,95
	Início do cultivo	51,80	9,80	6,20	26,63	58,25	84,85
7	CL-ERI (B)	17,89	9,21	5,79	16,82	2,67	19,39
	CL-ERI	127,79	0,93	4,41	26,67	95,63	122,30
7	CE-ERI (B)	29,94	8,52	5,30	19,51	10,62	30,13
	CE-ERI	136,81	0,94	4,73	28,71	103,25	131,95

6.6 Principais Mecanismos de Remoção e Cinética dos Antibióticos Estudados pelo Consórcio Microalgas-Bactérias

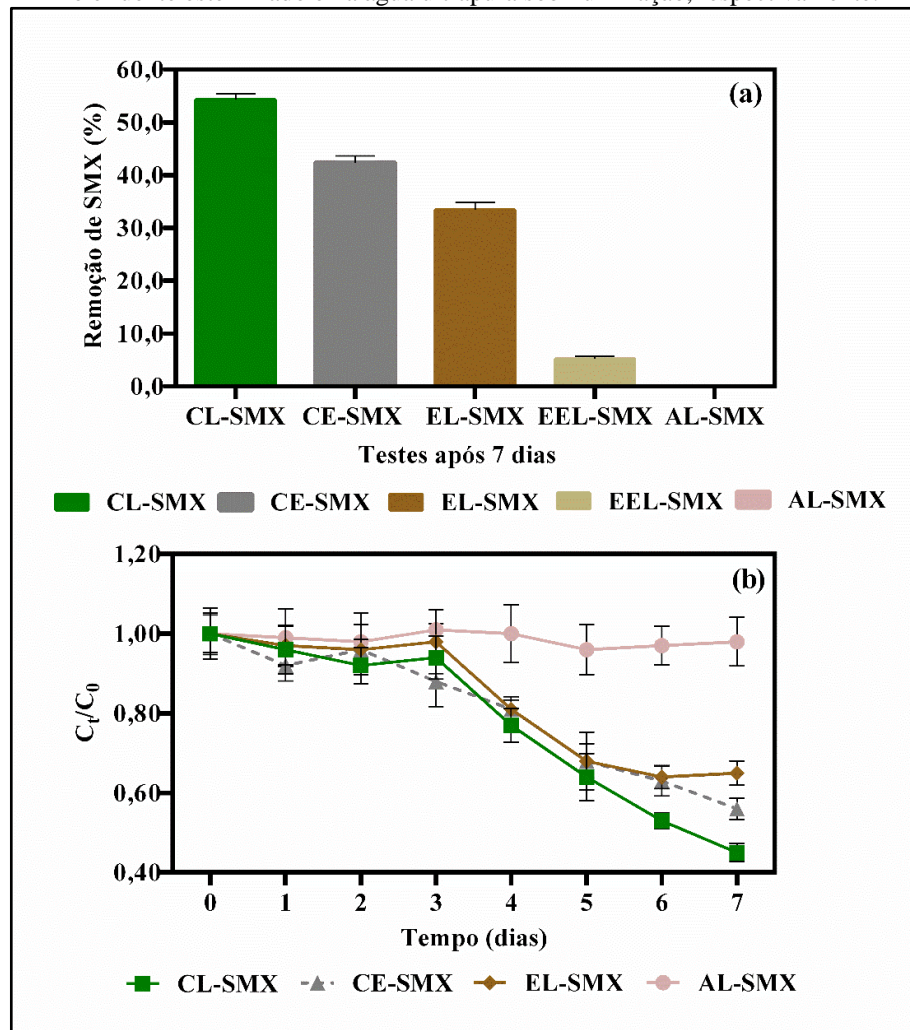
6.6.1 SMX

No cultivo realizado sob iluminação (CL-SMX) foi removido $54,3\% \pm 2,35$ de SMX. Os controles realizados no escuro (CE-SMX) e no efluente da ETE sem a adição do inóculo (EL-SMX) apresentaram remoções de SMX iguais a $42,31\% \pm 2,59$ e $33,42\% \pm 1,49$, respectivamente. Na Figura 6.16a são mostradas as taxas de remoção de SMX para os experimentos realizados. A cinética de remoção do SMX, durante o período de cultivo, é apresentada na Figura 6.16b. O consórcio microalgas-bactérias cultivado sob iluminação aumentou a eficiência de remoção em 12,03 e 20,92% quando comparado aos controles CE-SMX e EL-SMX, respectivamente.

A biodegradação do SMX foi igual a $47,86\% \pm 2,35$ (CL-SMX) e $42,31\% \pm 2,59$ (CE-SMX). A quantidade de SMX bioadsorvido nas paredes celulares das microalgas foi igual a $1,26\% \pm 0,25$ (CL-SMX). Para o controle realizado no escuro (CE-SMX) a bioadsorção foi menor que o limite de quantificação do método, <LQM, ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). A bioacumulação do SMX pelas microalgas foi insignificante. A remoção do SMX pelos fatores abióticos realizada no efluente esterilizado (EEL-SMX) foi igual a $5,22\% \pm 0,45$ e a remoção realizada em água ultrapura (AL-SMX) foi desprezível (Figura 6.16a).

Os valores da constante cinética de remoção (k) do SMX para o consórcio microalgas-bactérias foram iguais a 0,12 e $0,083 \text{ d}^{-1}$ para os cultivos realizados na presença (CL-SMX) e na ausência de luz (CE-SMX), respectivamente, após sete dias de cultivo.

Figura 6.16 - (a) Taxa de remoção (%) do SMX, após sete dias de cultivo e (b) cinética de remoção para os cultivos fortificados com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de SMX. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. As siglas EL, EEL e AL representam os testes realizados no efluente, no efluente esterilizado e na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.



6.6.2 TMP e a mistura TMP/SMX

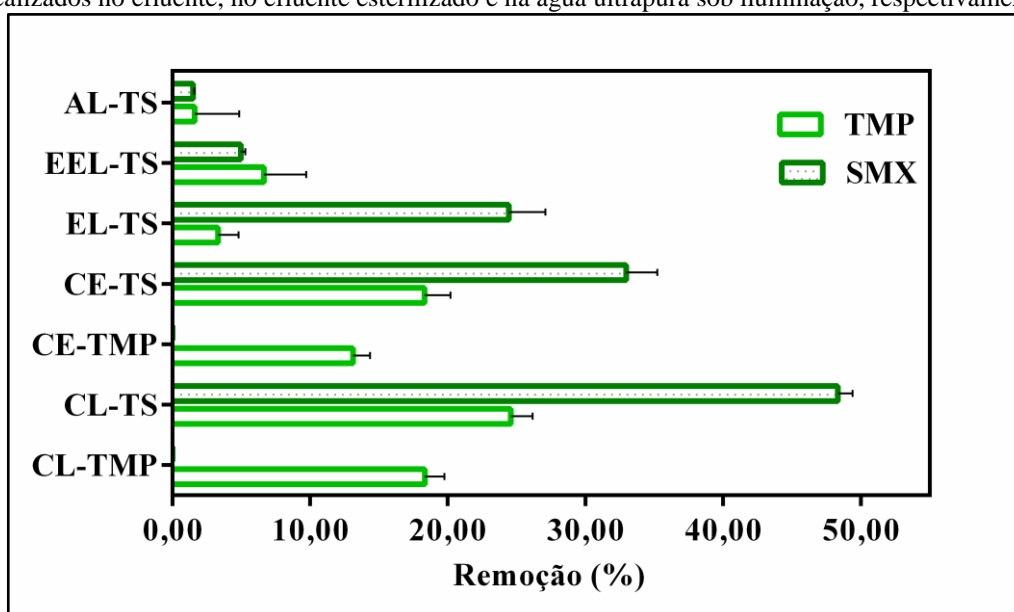
A remoção total de TMP foi igual a $18,34\% \pm 1,42$ para o cultivo realizado sob iluminação (CL-TMP). A remoção de TMP e SMX foram iguais a $24,58\% \pm 1,58$ e $48,34 \pm 1,07$, respectivamente, para o experimento realizado com a mistura desses antibióticos (CL-TS) sob as mesmas condições. Para os controles feitos no escuro, a remoção de TMP foi igual a $13,13\% \pm 1,23$ (CE-TMP), enquanto a remoção de TMP e SMX para a mistura destes antibióticos foram iguais a $18,32\% \pm 1,89$ e $32,96\% \pm 2,25$ (CE-TS). As remoções totais de TMP e SMX, após sete dias de cultivo, são apresentadas na Figura 6.17. Foi observado um aumento de 28,41% na remoção da TMP para o cultivo feito com esse antibiótico isolado na presença de luz quando comparado ao cultivo realizado no escuro. Para o teste CL-TS foi obtido um aumento na remoção de 25,67% (TMP) e 31,82% (SMX) quando comparado aos controles realizados no escuro.

As remoções da TMP pelo processo de biodegradação utilizando o consórcio microalgas-bactérias foram iguais a $9,15\% \pm 1,23$ (CL-TMP) e $15,93\% \pm 1,12$ (CL-TS). Para os controles a biodegradação da TMP foi igual a $10,52\% \pm 1,82$ (CE-TMP), $15,80\% \pm 1,45$ (CE-TS) e $3,32\% \pm 0,78$ (EL-TS). A quantidade de SMX biodegradado foi igual a $43,36\% \pm 0,75$ (CL-TS). Para os controles realizados no escuro (CE-TS) e no efluente da ETE sem a adição do inóculo (EL-TS) a biodegradação do SMX foi de $32,96\% \pm 2,25$ e $24,43\% \pm 2,66$, respectivamente.

As concentrações de TMP removidas pelo mecanismo de bioadsorção, no último dia de cultivo, foram iguais a $1,03\% \pm 0,07$ (CL-TMP) e $1,60\% \pm 0,30$ (CE-TMP). Enquanto, a quantidade de TMP bioadsorvida para os cultivos fortificados com a mistura TMP/SMX foram iguais a $1,03\% \pm 0,04$ (CL-TS) e $1,32\% \pm 0,10$ (CE-TS). A remoção da TMP pelo mecanismo de bioacumulação foi igual a $1,52\% \pm 0,10$ (CL-TMP) e $1,01\% \pm 0,01$ (CE-TMP). Enquanto a bioacumulação da TMP para os cultivos com a mistura TMP/SMX foram iguais a $0,98\% \pm 0,03$ (CL-TS) e $1,15\% \pm 0,02$ CE-TS. Os mecanismos de bioadsorção e bioacumulação do SMX foram menores do que o limite de quantificação do método (<LQM) para os cultivos realizados com e sem iluminação.

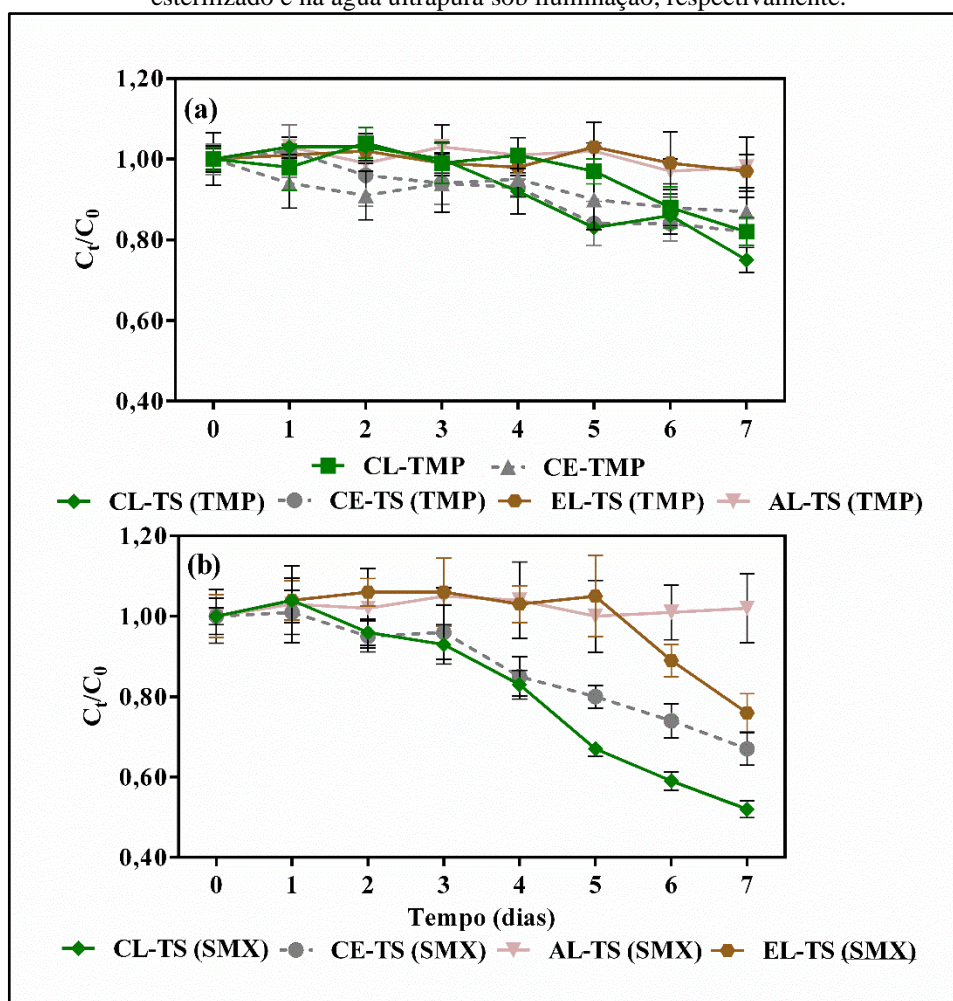
A remoção dos antibióticos TMP e SMX pelos fatores abióticos no efluente esterilizado da ETE (EEL-TS) foi igual a $6,64\% \pm 0,77$ e $4,98\% \pm 0,32$, respectivamente. A remoção desses antibióticos em água ultrapura (AL-TS) foi irrelevante (Figura 6.17).

Figura 6.17 - Taxa de remoção (%) de TMP e SMX para os cultivos fortificados com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de TMP e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ da mistura TMP/SMX, após sete dias de cultivo. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. As siglas EL, EEL e AL representam os testes realizados no efluente, no efluente esterilizado e na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.



As cinéticas de remoção da TMP para as bateladas experimentais realizadas com este antibiótico isolado e também com a mistura TMP/SMX são apresentadas na Figura 6.18a. Enquanto, a cinética de remoção do SMX é ilustrada na Figura 6.18b. Os valores da constante cinética de remoção (k) variaram de 0,018 a 0,057 d^{-1} para os experimentos contendo TMP. Os valores de k para remoção do SMX foram iguais a 0,10 d^{-1} (CL-TS) e 0,065 d^{-1} (CE-TS).

Figura 6.18 - Cinética de remoção (%) da TMP e do SMX para os cultivos fortificados com 50 $\mu g L^{-1}$ de TMP e 50 $\mu g L^{-1}$ da mistura TMP/SMX. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. As siglas EL, EEL e AL representam os testes realizados no efluente, no efluente esterilizado e na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.

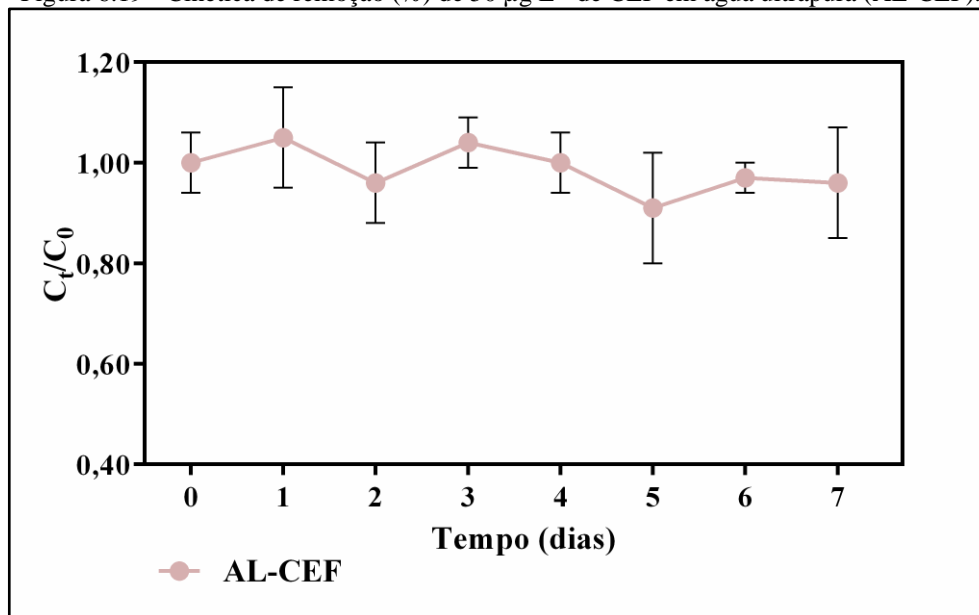


6.6.3 CEF

Inicialmente o cultivo fortificado com 50 $\mu g L^{-1}$ de CEF foi realizado durante sete dias. No entanto, no 3º dia de cultivo mais de 90% da CEF tinha sido degradada tanto no teste sob iluminação (CL-CEF) quanto nos controles realizados no escuro (CE-CEF) e sem a presença do inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias (EL-CEF). A remoção da CEF ocorreu

principalmente entre o 2º e 3º dia de cultivo. A remoção da CEF pelos fatores abióticos realizada em água ultrapura (AL-CEF) foi irrelevante (Figura 6.19).

Figura 6.19 - Cinética de remoção (%) de 50 µg L⁻¹ de CEF em água ultrapura (AL-CEF).

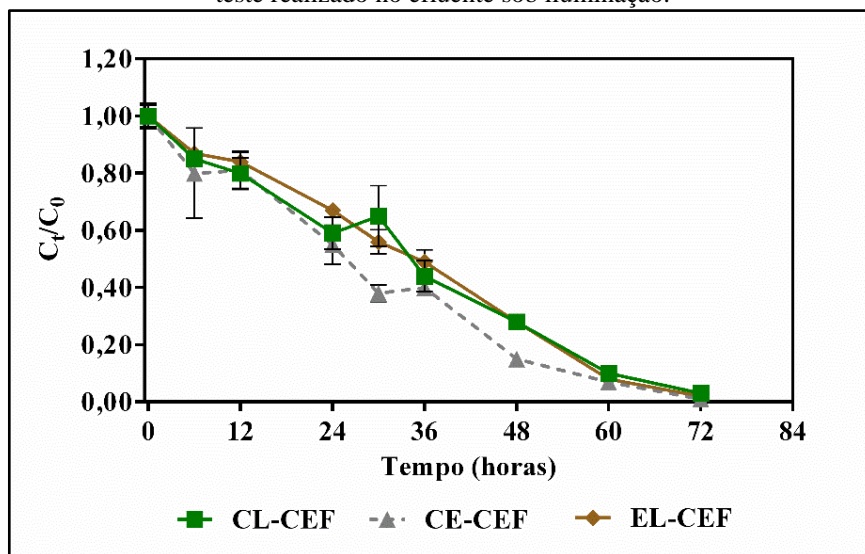


Fez-se uma nova batelada experimental para avaliar a cinética de remoção da CEF. Os cultivos foram realizados por quatro dias (96 horas), na qual a concentração residual da CEF foi determinada três vezes por dia, conforme descrito, anteriormente, no capítulo 5 (seção 5.11). A remoção total de CEF foi igual a 96,54% ± 5,31 para o teste CL-CEF, enquanto as remoções totais para os controles foram iguais a 98,95% ± 7,89 (CE-CEF) e 98,39% ± 2,09 (EL-CEF), depois de 72 horas. Após esse tempo de cultivo a concentração de CEF foi <LQM. É possível observar na Figura 6.20 que mais de 50% da CEF foi removida após 36 horas para os testes realizados.

A remoção da CEF pelos mecanismos de bioadsorção e bioacumulação foram <LQM. A degradação abiótica da CEF no efluente secundário esterilizado (EEL-CEF) foi < 1,0 % e a degradação desse antibiótico em água pura (AL-CEF) foi insignificante, conforme observado anteriormente na Figura 6.19.

Os parâmetros cinéticos associados à remoção da CEF foram determinados, na qual os valores da constante cinética de remoção (k) foram iguais a 1,10 d⁻¹ (CL-CEF) e 1,01 d⁻¹ (CE-CEF), depois de 72 horas de cultivo.

Figura 6.20 - Cinética de remoção (%) para os cultivos fortificados com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de CEF. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz. A sigla EL representa o teste realizado no efluente sob iluminação.



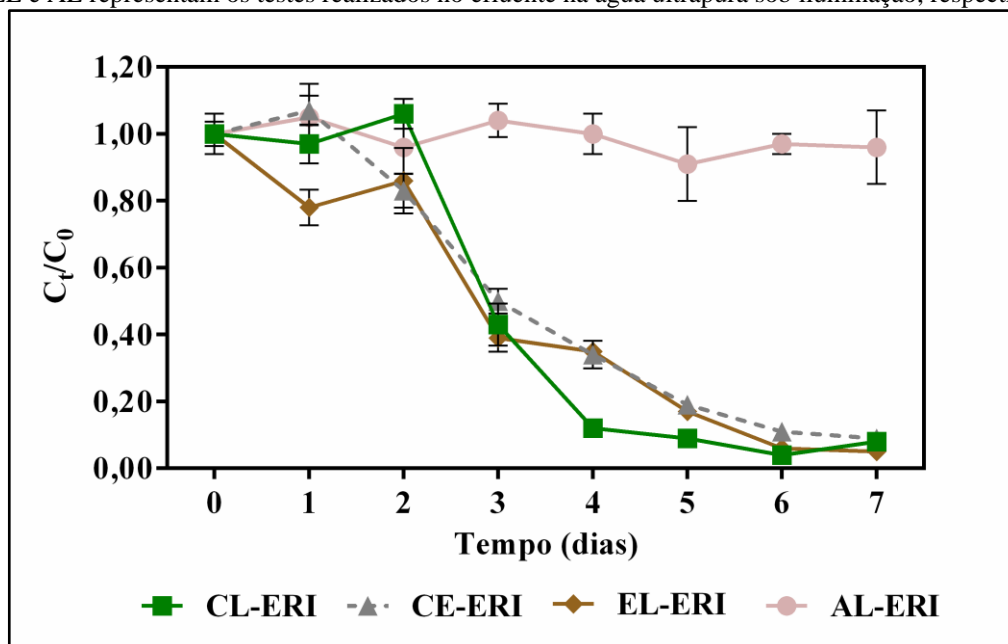
6.6.4 ERI

A remoção total da ERI foi igual a $92,38\% \pm 3,13$ para o teste CL-ERI. Para os controles realizados no escuro (CE-ERI) e sem a adição do inóculo no efluente da ETE (EL-ERI) a remoção da ERI foi igual a $91,19\% \pm 2,53$ e $94,50\% \pm 4,88$. Observa-se que a remoção da ERI ocorreu principalmente entre o 2º e 4º dia de cultivo (Figura 6.21).

A bioadsorção e bioacumulação da ERI foram menores do que o limite de quantificação do método ($<LQM$). A remoção da ERI pelos fatores abióticos avaliada em água ultrapura foi irrelevante. Por outro lado, a remoção da ERI no efluente esterilizado da ETE foi de $30,44\% \pm 3,19$ (EEL-ERI).

Os valores da constante cinética de remoção (k) da ERI foram iguais a $0,59 \text{ d}^{-1}$ (CL-ERI) e $0,40 \text{ d}^{-1}$ (CE-ERI). O maior valor de k para o teste CL-ERI indica que a atividade autotrófica das microalgas aumentou a taxa de remoção da ERI.

Figura 6.21 - Cinética de remoção (%) para os cultivos fortificados com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de ERI. CL e CE representam os cultivos contendo o consórcio microalgas-bactérias na presença e na ausência de luz, respectivamente. As siglas EL e AL representam os testes realizados no efluente na água ultrapura sob iluminação, respectivamente.



6.6.5 Remoção dos antibióticos estudados

De forma geral, para as bateladas experimentais realizadas foi observado maior taxa de remoção dos antibióticos selecionados para os cultivos realizados sob iluminação LED, quando comparado aos controles realizados no escuro. Logo, a interação simbiótica existente entre o crescimento autotrófico das microalgas e as bactérias heterotróficas presentes no consórcio foram responsáveis por potencializar a biodegradação dos antibióticos avaliados. A remoção dos antibióticos para os controles realizados no escuro ocorreu, provavelmente, devido à atividade heterotrófica realizada tanto pelas bactérias quanto pelas microalgas presentes no cultivo.

Xiong *et al.* (2019a) avaliaram a remoção de SMX utilizando a espécie de microalgas *Scenedesmus obliquus* cultivada em meio de cultura por 11 dias, na qual a remoção de SMX foi igual a 29,00%. Bai e Acharya (2017) investigaram a remoção de TMP e SMX em água de rio utilizando a as microalgas *Nannochloris sp.*, na qual os valores obtidos foram iguais a 11,0 % (TMP) e 32,0 % (SMX), após 14 dias de cultivo.

Xiong *et al.* (2019b) avaliaram a remoção do antibiótico sulfametazina nas concentrações de 0, 1, 0,5 e 1,0 mg L^{-1} , utilizando a espécie de microalgas *Scenedesmus obliquus*, na qual as remoções foram iguais a 18,5, 22,3 e 23,6% para as respectivas concentrações. Ao adicionar SMX na concentração de 0,2 mg L^{-1} a remoção de sulfametazina

aumentou para 38,2, 51,8 e 28,3%, respectivamente. Esses autores justificaram o aumento na remoção de sulfametazina pela indução de enzimas relacionadas à presença do SMX, na qual essas enzimas podem ter maior afinidade pela sulfametazina (Xiong *et al.*, 2019b). No presente estudo a adição de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX aumentou a taxa de remoção da TMP de 18,34% \pm 1,42 para 24,58% \pm 1,58, correspondendo a um aumento na eficiência de remoção da TMP em 25,37%. Portanto, o aumento na remoção de TMP pode estar relacionado com a presença de enzimas que possuam maior afinidade pela TMP quando comparadas ao SMX.

Guo e Chen (2015) utilizaram um sistema combinado de lodos ativados e microalgas (*Chlorella pyrenoidosa*) para remover cefalosporinas numa concentração inicial de 10 mg L^{-1} , inclusive a CEF. A remoção da CEF foi de 48,55% (após 24 horas) e 94,93% (após 48 horas), utilizando apenas as microalgas cultivadas em meio de cultura BG-11 a 25 °C. A remoção da CEF utilizando apenas o tratamento de lodos ativados foi menor do que 23,0%. Por outro lado, o sistema combinado de lodos ativados e microalgas removeram 97,91%, após 48 horas. Além disso, a concentração adicionada de CEF não inibiu o crescimento das microalgas. No presente estudo a remoção da CEF foi maior do que 95% após três dias de cultivo, sendo utilizado uma matriz complexa, na qual as concentrações de CEF eram mais próximas dos valores frequentemente determinados nos efluentes secundários.

Suarez *et al.* (2010) estudaram a remoção de TMP, SMX e ERI e outros microcontaminantes sob condições de nitrificação (aeróbia) e desnitrificação (anóxica). Foi observado que a TMP e o SMX apresentaram alta resistência à remoção biológica em condições aeróbias, enquanto para a ERI foi observado uma remoção maior do que 80%.

A biodegradação dos antibióticos no efluente secundário sem a presença do inóculo, para os controles cultivados sob iluminação (EL-SMX, EL-TMP, EL-TS, EL-CEF e EL-ERI) ocorreu devido aos microorganismos presentes no próprio efluente utilizado. Os maiores valores de biodegradação foram observados para as bateladas experimentais realizadas com os antibióticos CEF e ERI. De acordo com Larcher & Yargeau (2012), a remoção de SMX em efluentes de águas residuárias variou entre 15 e 90% para diferentes espécies de bactérias (*Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus equi* e *Bacillus firmus*).

Pérez *et al.* (2005), avaliaram a biodegradabilidade de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TMP e SMX em esgoto, sendo utilizados reatores aerados. Os resultados encontrados mostraram que a TMP foi mais recalcitrante do que o SMX. Bai e Acharya (2016; 2017) estudaram a remoção de TMP e SMX utilizando monoculturas de microalgas (*Nannochloris sp.*), sendo a TMP menos degradada do que o SMX. Sendo assim, os resultados obtidos na presente pesquisa vão de encontro com os resultados reportados na literatura. Além disso, mais estudos são necessários para compreender

o mecanismo de biodegradação dos antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI pelas bactérias presentes no cultivo.

A biodegradação foi o principal mecanismo de remoção de todos antibióticos avaliados neste estudo (SMX, TMP, CEF e ERI), conforme pode ser observado na Tabela 6.4. A utilização do consórcio natural microalgas-bactérias, cultivado em efluentes secundários sob iluminação, aumentou a eficiência de remoção dos antibióticos. Esse resultado foi observado principalmente para o SMX e para a TMP, sendo esses os antibióticos mais recalcitrantes dentre os estudados. Várias pesquisas que investigaram a remoção de antibióticos e outros MPEs utilizando cultivos de microalgas atribuíram à biodegradação o principal mecanismo de remoção (Eio *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2016b; Song *et al.*, 2019). Kiki *et al.* (2020) avaliaram a remoção de um mix constituído por 10 antibióticos, dentre eles o SMX e a TMP, utilizando quatro espécies isoladas de microalgas cultivadas em esgoto sintético. Os resultados obtidos por esses autores demonstraram que a biodegradação foi o principal mecanismo de remoção. Enquanto, a bioadsorção, bioacumulação e os fatores abióticos tiveram uma baixa contribuição na remoção dos antibióticos.

A remoção de antibióticos persistentes quando se utiliza consórcios microalgas-bactérias acontece, principalmente, pela ação das bactérias (Zhu *et al.*, 2019). No entanto, as microalgas contribuíram para a remoção dos antibióticos SMX e TMP, pois foi observada uma maior remoção desses antibióticos para os cultivos realizados sob condições de iluminação. De acordo com Subashchandrabose (2013) a natureza mixotrófica das microalgas, incluindo as espécies do gênero *Chlorella*, possuem a capacidade de degradar micropoluentes. A biodegradação de poluentes orgânicos por cultivos de microalgas formam intermediários com uma menor toxicidade quando comparado aos contaminantes originais (Xiong *et al.*, 2016a). Kiki *et al.* (2020) identificaram 10 subprodutos da degradação de um mix de antibióticos utilizando cultivo de microalgas, na qual os subprodutos apresentaram menor toxicidade do que os próprios antibióticos. Na presente pesquisa não foram determinados os principais subprodutos de degradação, pois seria necessário trabalhar com concentrações mais elevadas dos antibióticos selecionados. No entanto, estudos no que tange a esse assunto são necessários.

Os antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI apresentaram valores baixos ou irrelevantes referentes às remoções pelos mecanismos de bioadsorção e bioacumulação (Tabela 6.4). Os estudos reportados na literatura que investigaram a remoção de antibióticos hidrofílicos (baixos valores de $\log K_{ow}$) utilizando cultivos de microalgas, também apresentaram valores insignificantes tanto para bioadsorção quanto para bioacumulação. Os antibióticos amoxicilina (Liu *et al.*, 2015b), levofloxacina (Xiong *et al.*, 2016b), ciprofloxacina (Xiong *et al.*, 2017c) e

TMP (Bai e Acharya, 2016), SMX (Kiki *et al.*, 2020) apresentaram baixos teores de bioadsorção e bioacumulação em cultivos de microalgas. No entanto, é importante ressaltar que nos referidos trabalhos e na presente pesquisa foi utilizado apenas a água para extrair os antibióticos aderidos na superfície da parede celular das microalgas. Sendo assim, o uso de outros solventes ou misturas de solventes poderiam resultar em uma maior eficiência de extração dos antibióticos bioadsorvidos.

A bioadsorção depende das características dos antibióticos (hidrofilicidade e estrutura química), e também das espécies de microalgas cultivadas. Em geral a bioadsorção é mais pronunciada em antibióticos hidrofóbicos quando comparado aos antibióticos hidrofílicos (Xiong *et al.*, 2017a). Os valores de $\log K_{ow}$ são iguais a 0,89 (SMX), 0,91 (TMP) e 0,65 (CEF). Portanto, os baixos valores de bioadsorção determinados para os antibióticos SMX, TMP e CEF podem ser explicados pela elevada hidrofilicidade desses antibióticos. No entanto, a ERI possui uma hidrofilicidade intermediária, sendo o valor de $\log K_{ow}$ igual a 2,60, mesmo assim a bioadsorção foi insignificante, uma vez que a estrutura química também influencia nesse mecanismo de remoção. De acordo com Kiki *et al.* (2020), a bioadsorção de macrolídeos foi menor do que 7% para diferentes espécies de microalgas, além disso a bioacumulação e os fatores abióticos contribuíram pouco para remoção dos antibióticos estudados.

A remoção dos antibióticos selecionados em água ultrapura sob iluminação foi insignificante para todas as bateladas experimentais (AL-SMX, AL-TS, AL-CEF e AL-ERI). Enquanto a remoção dos antibióticos pelos fatores abióticos no efluente esterilizado da ETE sob iluminação foi menor do que 7,0% (EEL-SMX, EEL-TS e EEL-CEF). Porém, para o controle EEL-ERI os fatores abióticos contribuíram com aproximadamente 30% da remoção total da ERI (Tabela 6.4). Contudo, para saber se a remoção da ERI foi por fotodegradação indireta ou hidrólise seria necessário realizar um controle com o efluente esterilizado no escuro.

A remoção dos antibióticos SMX e TMP pelos fatores abióticos provavelmente ocorreu devido à fotodegradação indireta, ou seja, a presença de fotossensibilizadores na própria matriz pode ter propiciado a remoção desses antibióticos para os cultivos sob iluminação. Além disso, de acordo com Kiki *et al.* (2020) ambos antibióticos são resistentes à hidrólise. Esses autores, obtiveram resultados de remoção por fotodegradação de 5-8% para as sulfonamidas (incluindo SMX) em esgoto sintético sob iluminação, após quarenta dias de cultivo. Portanto, a degradação observada no controle EEL-TS pode ter ocorrido devido à matriz ter desempenhado um papel no início do processo de fotodegradação. Estudos anteriores também mostraram baixa remoção dos antibióticos levofloxacina (Xiong *et al.*, 2016b), ciprofloxacina (Xiong *et al.*, 2017c) e SMX (Kurade *et al.*, 2019) pelo processo de fotodegradação.

De acordo com Bai e Acharya (2017) a ocorrência natural de fotossensibilizadores, como a matéria orgânica dissolvida, podem ser responsáveis por iniciar o processo de fotodegradação dos microcontaminantes orgânicos. Os efluentes provenientes de ETEs contém matéria orgânica e nitrato que podem influenciar na fotodegradação. Além disso, o processo de nitrificação aumenta a concentração de nitrato no cultivo, que é um fotossensibilizador para produção de radicais hidroxila (Ryan *et al.*, 2011). Logo, nesta pesquisa a fotodegradação abiótica pode ter sido iniciada por fotossensibilizadores de ocorrência natural presentes no próprio efluente secundário utilizado.

A influência dos fatores abióticos na remoção de SMX foi investigada em meio de cultura esterilizado. As remoções obtidas foram iguais a 0,0, 2,1 e 1,0% para concentrações de SMX de 50, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, após 14 dias de cultivo (Xiong *et al.*, 2019a). Guo e Chen (2015) determinaram a contribuição dos fatores abióticos na remoção de algumas cefalosporinas, incluindo a CEF. As remoções obtidas pelos fatores abióticos foram menores do que 15%. Portanto, os resultados encontrados no presente estudo foram inferiores aos resultados encontrados por esses autores.

Jaén-Gil *et al.* (2018) investigaram a remoção abiótica da ERI em águas residuárias. A remoção foi de $22 \pm 32\%$ e $21 \pm 33\%$ da ERI ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) para as bateladas realizadas na ausência e na presença de luz, respectivamente. Esses resultados sugerem que a hidrólise tem um papel preponderante na remoção da ERI, uma vez que a remoção no escuro e na presença de luz foram similares. Isto ocorre devido à instabilidade da classe dos macrolídeos, incluindo a ERI, em solução aquosa (Fan e He, 2011).

De acordo Le-Minh *et al.* (2010) a ERI é sensível aos valores de pH comumente encontrados nos efluentes secundários (6,5 e 8,0). Nessa faixa de pH a ERI coexiste com sua forma desidratada (ERI-H₂O). Fan e He (2011) em seus estudos cultivaram consórcios microbianos contendo o gene da esterase (*ereA*), que é capaz de esterificar a ERI. Os experimentos realizados por esses autores foram feitos em reatores de 4 L contendo efluente sintético, na qual a batelada experimental foi realizada a temperatura ambiente (25 - 27°C) em uma faixa de pH de 6,9 - 8,1. Os resultados mostraram uma completa remoção de ERI ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) dentro de três dias, ocasionada pelos microrganismos contendo o gene da esterase.

Na presente pesquisa, a remoção da ERI ocorreu devido à biodegradação desse antibiótico pelos microrganismos presentes no próprio efluente da ETE e pela contribuição dos fatores abióticos. No entanto, a atividade autotrófica realizada pelas microalgas proporcionou um aumento de 32% na taxa de remoção (Tabela 6.4). Segundo Jaén-Gil *et al.* (2018) a biodegradação da ERI utilizando microalgas formam mais subprodutos quando comparado à

degradação abiótica. Logo, torna-se necessário a investigação da toxicidade dos subprodutos gerados.

De acordo com os resultados de Jaén-Gil *et al.* (2018) aproximadamente 20% da concentração inicial da ERI foram transformadas em eritromicina B, resultante de uma desidroxilação. Portanto, existe a necessidade de monitorar a eritromicina B em estudos futuros. Entre os subprodutos mais comuns detectados por estes autores incluem a abertura do anel macrocíclico por hidrólise do grupo éster, seguido de condensação. As estruturas propostas são apresentadas na referência mencionada (Jaén-Gil *et al.*, 2018).

Os valores da constante cinética de remoção (k) para todos os antibióticos foram maiores para os cultivos realizados sob iluminação (CL) quando comparados aos cultivos realizados no escuro (CE), principalmente, para os antibióticos SMX, TMP e ERI. Assim, os valores de k para os experimentos realizados sob iluminação LED com os antibióticos individuais foram iguais $0,12 \text{ d}^{-1}$ (CL-SMX) $0,045 \text{ d}^{-1}$ (CL-TMP), $1,10 \text{ d}^{-1}$ (CL-CEF) e $0,59 \text{ d}^{-1}$ (CL-ERI). Para o teste CL-TS os valores de k foram iguais a $0,057 \text{ d}^{-1}$ (TMP) e $0,10 \text{ d}^{-1}$ (SMX). A CEF e a ERI foram os antibióticos que apresentaram as maiores taxas de remoção, com valores maiores do que 90%. A remoção de ambos antibióticos ocorreu, principalmente, devido à atividade dos microrganismos presentes no próprio efluente. Os cultivos realizados com a CEF foram os que apresentaram maior taxa de remoção, indicando a presença de enzimas β -lactamases no inóculo, e possivelmente em microrganismos do próprio efluente da ETE. O SMX apresentou uma taxa de remoção intermediária com valores variando entre 32,96 e 54,34%. A TMP foi o antibiótico mais recalcitrante dentre os avaliados, na qual a taxa de remoção variou entre 13,13 e 24,58%. Os parâmetros cinéticos k , tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), bem como o R^2 são apresentados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4 - Balanço de massa da remoção dos antibióticos selecionados pelo consórcio microalgas-bactérias e os parâmetros cinéticos de remoção.

Experimentos	Balanço de massa de remoção dos antibióticos selecionados (%)				Parâmetros cinéticos			
	Biodegradação	Bioadsorção	Bioacumulação	Fatores abióticos	Remoção total	k (d ⁻¹)	T _{1/2} (dia)	R ²
CL-SMX	47,86 ± 2,35	1,26 ± 0,25	<LQM	5,22 ± 0,45	54,34 ± 2,35	0,12	5,78	0,90
CE-SMX	42,31 ± 2,59	<LQM	<LQM	-	42,31 ± 2,59	0,083	8,35	0,93
CL-TMP	9,15 ± 1,23	1,03 ± 0,07	1,52 ± 0,10	6,64 ± 0,77	18,34 ± 1,42	0,045	15,50	0,85
CE-TMP	10,52 ± 1,82	1,60 ± 0,30	1,01 ± 0,01	-	13,13 ± 1,23	0,018	38,72	0,93
CL-TS(TMP)	15,93 ± 1,12	1,03 ± 0,07	0,98 ± 0,03	6,64 ± 0,77	24,58 ± 1,58	0,057	12,16	0,94
CL-TS/(SMX)	43,36 ± 0,75	<LMQ	<LMQ	4,98 ± 0,32	48,34 ± 1,07	0,10	5,73	0,96
CE-TS(TMP)	15,80 ± 1,45	1,32 ± 0,10	1,15 ± 0,02	-	18,32 ± 1,89	0,037	18,53	0,94
CE-TS/(SMX)	32,96 ± 2,25	<LMQ	<LMQ	-	32,96 ± 2,25	0,065	10,63	0,98
CL-CEF	96,54 ± 5,31	<LQM	<LQM	< 1	96,54 ± 5,31	1,10	0,63	0,91
CE-CEF	98,95 ± 7,89	<LQM	<LQM	-	98,95 ± 7,89	1,01	0,68	0,93
CL-ERI	61,94 ± 3,19	<LQM	<LQM	30,44 ± 3,19	92,38 ± 3,13	0,59	1,17	0,90
CE-ERI	60,75 ± 4,88	<LQM	<LQM	30,44 ± 3,19	91,19 ± 4,88	0,40	1,56	0,99

De acordo com Song *et al.* (2019), os parâmetros cinéticos de remoção dependem da concentração inicial dos antibióticos e também das espécies de microalgas. O tempo de meia-vida de remoção ($t_{1/2}$) para cada antibiótico é justificado pela diferença na estrutura molecular do fármaco e também pela diferença de metabolismo de cada espécie de microalga.

Xiong *et al.* (2016b), avaliaram a remoção do antibiótico levofloxacina utilizando as microalgas *Chlorella vulgaris*, cultivadas em meio de cultura BBM por 11 dias. Os valores de k variaram entre 0,0119 e 0,0329 d^{-1} . Os valores de k da remoção do antibiótico ciprofloxacina pelas microalgas *Chlamydomonas mexicana*, cultivadas em meio de cultura BBM variaram entre 0,0121 e 0,079 d^{-1} , após 11 dias (Xiong *et al.*, 2017c). Xiong *et al.* (2019a) avaliaram a cinética de remoção dos antibióticos sulfametazina e SMX em diferentes concentrações iniciais (25 - 250 $\mu g L^{-1}$) utilizando monocultura de microalgas *Scenedesmus obliquus* em meio de cultivo BBM. Os valores obtidos de k variaram de 0,037 a 0,093 d^{-1} (sulfametazina) e 0,035 - 0,061 d^{-1} (SMX), após 12 dias de cultivo. Todos os valores de k mencionados anteriormente foram calculados por um modelo cinético de primeira ordem. Sendo assim, o presente estudo apresentou maiores taxas de remoções para os antibióticos selecionados, na qual foi utilizado um consórcio natural de microalgas-bactérias cultivado em efluentes secundários reais. Logo o consórcio utilizado pode ser uma alternativa promissora na remoção de antibióticos, e possivelmente de outros MPEs.

6.7 Avaliação dos Genes de Resistência aos Antibióticos (GRAs)

As abundâncias absolutas e relativas dos genes de resistência *sul1*, *bla_{TEM}* e *ermB* associados aos antibióticos SMX, CEF e ERI, respectivamente, foram determinadas para a suspensão microalgal (inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias em efluente da ETE, 10% v/v). Essas determinações foram feitas para os cultivos realizados sob iluminação (CL-SMX, CL-TS, CL-CEF e CL-ERI), no início e após sete dias de cultivo. Cabe informar que, apesar do inóculo ter origem ambiental em área sem risco de contaminação por esgotos, os três GRAs investigados foram detectados no início do ensaio, na faixa entre 10^2 e 10^6 cópias/mL, indicando que as bactérias presentes já continham elementos genéticos de resistência.

De fato, vários trabalhos indicam a presença de GRAs em amostras de águas contaminadas e de ambientes aquáticos. Chen *et al.* (2015) detectaram os genes *sul1* e *sul2* em todas as amostras analisadas (água e sedimentos de rios). O gene *ermB* foi detectado em concentrações pelo menos 100 vezes menores, quando comparado aos genes associados às sulfonamidas em efluentes secundários (Chen *et al.*, 2015). Além disso, as concentrações desses

genes estão diretamente associadas com o impacto antropogênico. Mais recentemente, Wu *et al.* (2020) detectaram 18 GRAs em amostras de águas subterrâneas e compararam com amostras de águas superficiais de rio (China). Os genes de resistência associados às sulfonamidas, *sul1* e *sul2*, foram os mais abundantes, variando entre 10^2 e 10^6 cópias/mL no período seco e entre 10^5 e 10^6 cópias/mL no período chuvoso. Liang *et al.* (2020) avaliaram 12 GRAs em amostras de água superficial de um lago na China, incluindo *sul1*, *sul2* e *ermB*, na qual os genes *sul2* foram os mais frequentemente detectados, alcançando valores na ordem de 10^5 cópias/mL.

Em área geograficamente próxima ao do presente trabalho, Furlan *et al.* (2020) encontraram vários elementos genéticos de resistência aos antibióticos em amostras do Rio Paraopeba, Minas Gerais. Dentre os genes investigados foram detectados *sul1*, *bla_{TEM}* e *ermB*, sendo o primeiro o mais abundante, na ordem de 10^3 cópias/mL. Os autores observaram que em regiões do Rio Paraopeba em que foram aportados resíduos de barragem de mineração, as abundâncias de todos os genes aumentaram, alcançando valores na ordem de 10^8 cópias/mL.

Comparando as faixas de abundância de GRAs, anteriormente citadas, em matrizes ambientais (água superficial e subterrânea) com as abundâncias observadas para os três GRAs no inóculo em estudo, percebe-se que os mesmos possuem ordens de grandeza similares. Esse fato sugere a presença natural de elementos de resistência aos antibióticos em bactérias encontradas nessas matrizes.

Considerando os ensaios realizados na presença dos antibióticos, apenas o gene *sul1* aumentou sua concentração absoluta, após sete dias de incubação, como pode ser visto na Figura 6.22a. A concentração de *sul1* no início do cultivo foi igual a $(1,00 \pm 0,23) \times 10^6$ cópias/mL e após sete dias as abundâncias de *sul1* foram iguais a $(3,91 \pm 0,49) \times 10^6$ cópias/mL (CL-SMX) e $(2,85 \pm 0,38) \times 10^6$ cópias/mL (CL-TS), com *p*-valores $<0,05$ (Figura 6.22a). Portanto, a concentração do gene *sul1* aumentou 391% e 285% para os testes CL-SMX e CL-TS, respectivamente. Esse aumento provavelmente ocorreu devido à pressão seletiva causada pela adição de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ SMX, resultando no aumento do número de bactérias que contém o gene *sul1*. Além disso, foi observado uma maior abundância absoluta de *sul1* para o teste CL-SMX quando comparado ao teste CL-TS. Esse resultado sugere que o efeito sinérgico existente entre a TMP e o SMX aumentou a sensibilidade das bactérias resistentes ao SMX, demonstrado pelo menor valor do gene *sul1* nesse ensaio.

A abundância absoluta inicial do gene de resistência *bla_{TEM}* foi igual a $(3,02 \pm 0,78) \times 10^5$ cópias/mL (CL-CEF), sendo esse valor diminuído em cerca de 72%, após os sete dias de cultivo $((8,37 \pm 0,74) \times 10^4$ cópias/mL). Similarmente, a concentração inicial do gene de resistência *ermB* foi igual a $(3,35 \pm 0,74) \times 10^4$ cópias/mL (CL-ERI), na qual foi observado

uma diminuição de aproximadamente 98% desse gene de resistência $((5,84 \pm 0,90) \times 10^2$ cópias/mL), após o período de cultivo. As diminuições dos genes *bla_{TEM}* e *ermB* foram significativas (p -valor $< 0,05$) (Figura 6.22a). É importante destacar que no início do cultivo (consórcio microalgas-bactérias em efluentes da ETE) já existem bactérias com os GRAs em estudo, uma vez que os antibióticos selecionados são comumente encontrados nos efluentes de ETEs. Portanto, os resultados encontrados sugerem que a adição de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de CEF ou ERI no cultivo foram suficientes para reduzir o número de BRAs que continham os genes *bla_{TEM}* e *ermB*. O sistema de tratamento utilizado foi eficiente na remoção dos antibióticos CEF e ERI ($> 90\%$ de remoção), resultando, portanto, na redução de bactérias contendo esses genes de resistência. Tanto a CEF quanto a ERI foram removidos, em sua maior parte, até o quarto dia de cultivo, resultando numa menor pressão seletiva ocasionada pelos respectivos antibióticos.

A abundância absoluta do RNAr 16S, que corresponde à quantidade de bactérias presentes nos ensaios, foi igual a $(7,88 \pm 5,28) \times 10^7$ cópias/mL no início do cultivo. Após sete dias, as concentrações de RNAr 16S foram iguais a $(1,25 \pm 0,009) \times 10^8$ cópias/mL (CL-SMX), $(1,51 \pm 1,11) \times 10^8$ cópias/mL (CL-TS), $(2,01 \pm 0,34) \times 10^7$ cópias/mL (CL-CEF) e $(4,93 \pm 1,24) \times 10^7$ cópias/mL (CL-ERI). Esses resultados indicam um aumento na quantidade de bactérias totais de 159% (CL-SMX) e 192% (CL-TS) e uma diminuição na quantidade de bactérias totais de 75% (CL-CEF) e 37% (CL-ERI), seguindo tendência semelhante à observada para os GRAs analisados. Esses resultados sugerem a manutenção da proporção GRAs/BRAs para os diferentes antibióticos selecionados. Para verificar isso, as concentrações dos genes de resistência *sull*, *bla_{TEM}* e *ermB* foram normalizadas pela quantidade correspondente do gene RNAr 16S, conforme apresentado na Figura 6.22b. A normalização, além de reduzir o efeito de possíveis flutuações da quantidade de bactérias totais, possibilita compreender a proporção entre a quantidade de genes e bactérias existente em cada experimento.

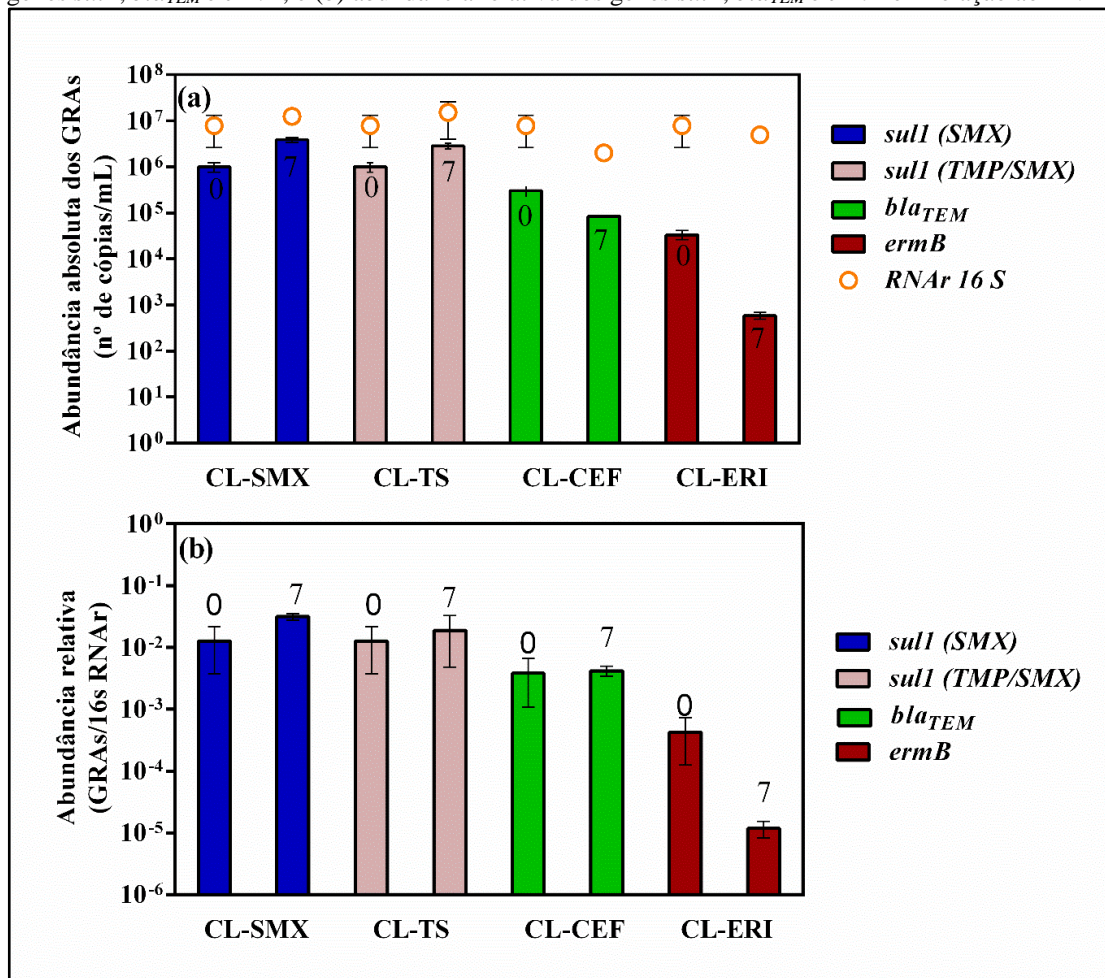
Como esperado, a abundância relativa do gene *sull* aumentou de $(1,27 \pm 0,89) \times 10^{-2}$ para $(3,14 \pm 0,53) \times 10^{-2}$ (CL-SMX) e $(1,89 \pm 0,34) \times 10^{-2}$ (CL-TS), correspondendo a 247% e 148%, respectivamente, após o período de cultivo (Figura 6.22b). Considerando os dados absolutos e relativos, observa-se que o número de BRAs resistentes às sulfonamidas, em relação número total de bactérias, aumentou ao final dos ensaios em que o SMX foi adicionado. É possível também ter ocorrido alteração da comunidade microbiana ao longo do cultivo, devido à adição de SMX, mas isso não foi investigado neste estudo. Outro fato importante é que a biodegradação de SMX observada nos experimentos CL-SMX (47,86%) e CL-TS (43,36%), não necessariamente ocorreu por bactérias que possuem *sull* (considerando que esse gene

codifica alteração do sítio-alvo do antibiótico e não de enzimas de degradação), mas pode ter ocorrido por outros microrganismos selecionados nas condições do ensaio.

Para o experimento CL-CEF as abundâncias relativas associadas ao gene *bla_{TEM}* foram iguais a $(3,83 \pm 1,46) \times 10^{-3}$ no início e $(4,17 \pm 2,17) \times 10^{-3}$ no final do cultivo (Figura 6.22b). Portanto, a proporção do número de bactérias resistentes aos β -lactâmicos, em relação ao número de bactérias totais, aumentou ligeiramente (cerca de 9%). Porém, o aumento de bactérias resistentes foi causado pela diminuição no número de bactérias no ensaio. A biodegradação da CEF foi de 96,54% (CL-CEF), sugerindo que esse mecanismo de remoção pode ter ocorrido por bactérias que possuem *bla_{TEM}*, uma vez este gene codifica a enzima β -lactamase.

Em relação a abundância relativa associada ao gene *ermB* foi observado uma diminuição de $(4,25 \pm 1,41) \times 10^{-4}$ para $(1,18 \pm 0,76) \times 10^{-5}$, correspondendo a 97% de redução (Figura 6.22b), neste caso gerado pela diminuição na concentração de bactérias que possuem o gene de resistência à ERI. A biodegradação da ERI foi de 61,94% (CL-ERI), no entanto, não necessariamente a biodegradação desse antibiótico ocorreu por bactérias que possuem *ermB*, uma vez que esse gene codifica a alteração do sítio-alvo do antibiótico e não de enzimas de degradação, assim como observado anteriormente para o gene *sull*.

Figura 6.22 - Abundância dos GRAs avaliados no início e após sete dias de cultivo; (a) concentrações médias dos genes *sull*, *bla_{TEM}* e *ermB*; e (b) abundância relativa dos genes *sull*, *bla_{TEM}* e *ermB* em relação ao RNAr 16S.



Na Tabela 6.5 são apresentados alguns trabalhos que avaliaram a presença de GRAs, inclusive dos genes *sull*, *bla_{TEM}* e *ermB*. Além disso, são apresentadas as concentrações de cada gene, bem como se houve diminuição ou aumento dos GRAs após o tratamento utilizado.

Tabela 6.5 - Ocorrência e quantificação de GRAs em diferentes tipos de tratamento, em que (-) representa a quantidade de genes removido e (+) representa o aumento na quantidade de genes após o tratamento.

Tratamentos	GRAs	Quantificação dos genes (cópias/mL)	Níveis de remoção ou incremento de genes (log)	Referências
Tratamento de água:				
convencional ^a	<i>sul1</i> e <i>sul2</i>	$1,8 \times 10^3$ a	4,64 log (-)	(Hu <i>et al.</i> , 2018)
avançado ^b		$2,4 \times 10^5$	3,96 log (-)	
Efluente secundário de duas ETEs	<i>ermB</i>	$7,0 \times 10^4$	(GRAs) 0,95-2,67 log (-)	(Mao <i>et al.</i> 2015)
Reator de tratamento de efluentes de antibióticos (leito de lodo granular expandido)				
	<i>bla_{TEM}</i>	$1,15 \times 10^5$ a $1,70 \times 10^6$	0,91 log (+)	(Meng <i>et al.</i> , 2020)
GRAs				
Tratamento convencional ^a de água	associados às sulfonamidas,	$10^2 \times 10^7$	2,46 log (-)	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
Tratamento avançado ^b	β -lactâmicos e macrolídeos		1,86 log (-)	
Consórcio microalgas-bactérias cultivadas em efluentes secundários de uma ETE)				
	<i>sul1</i>	$1,00 \times 10^6$	0,54 log (+) (CL-SMX) 0,45 log (+) (CL-TS)	Presente estudo
	<i>bla_{TEM}</i>	$3,02 \times 10^5$	0,56 log (-)	
	<i>ermB</i>	$3,35 \times 10^4$	1,75 log (-)	

^a = incluem coagulação, sedimentação, filtração e cloração.

^b = combinação entre ozônio e carvão ativado biológico.

O fenômeno da resistência bacteriana associado à classe das sulfonamidas é generalizado em muitas bactérias, o que reflete no seu uso extensivo, principalmente, na medicina veterinária ao longo de muitos anos (Carvalho e Santos, 2016). De acordo com Santos *et al.* (2006) a resistência bacteriana se desenvolve mais lentamente com a utilização da combinação SMX/TMP quando comparado aos respectivos antibióticos isoladamente.

Meng *et al.* (2020) investigaram o efeito de elevados níveis de CEF (200 mg L⁻¹) na disseminação e remoção de GRAs, em amostras de efluentes e de lodo, provenientes de reatores anaeróbicos. Esses reatores eram utilizados no tratamento de efluentes de antibióticos. A adição de CEF afetou o número de bactérias hospedeiras de GRAs, bem como alterou a comunidade bacteriana hospedeira dos genes de resistência. A concentração GRAs associados aos β-lactâmicos variaram de $1,35 \times 10^5$ a $1,69 \times 10^7$ cópias/mL. O gene *bla_{TEM}*, especificamente, foi detectado no esgoto em concentrações de $1,15 \times 10^5$ a $1,70 \times 10^6$ cópias/mL. No entanto, a concentração total de todos os GRAs analisados nos efluentes aumentaram em 0,91 log. Além disso, também foi observado um acúmulo dos genes *sul2* e *ermB* nos efluentes. Portanto, a presença de CEF não afetou apenas a remoção de genes de resistência associados aos β-lactâmicos, mas também afetaram negativamente na remoção de outros GRAs.

Mao *et al.* (2015) encontraram correlações significativas entre a abundância relativa de ARGs e as correspondentes concentrações residuais de antibióticos no efluente da ETE. Logo, os resultados obtidos no presente estudo são compatíveis com os resultados encontrados por Mao *et al.* (2015). Conforme discutido anteriormente, nos testes CL-SMX e CL-TS foram removidos $54,34\% \pm 2,35$ e $48,34\% \pm 1,07$ de SMX, respectivamente, durante o período de cultivo. Assim a quantidade residual de SMX remanescente propiciou a proliferação de bactérias contendo o gene de resistência *sul1*. Para os testes CL-CEF e CL-ERI as remoções dos antibióticos foram iguais a $96,54\% \pm 5,31$ (CEF) e $92,38\% \pm 3,13$ (ERI) e ocorreram no 3º e 4º dia de cultivo. Logo, a concentração residual desses antibióticos foi mínima, sendo observado um decaimento significativo na quantidade de bactérias contendo o gene de resistência *ermB* no final do cultivo. Para o gene *bla_{TEM}* foi observado apenas um ligeiro aumento no número de bactérias contendo esse gene de resistência.

As concentrações de vários metais pesados em ambientes naturais e em efluentes secundários podem induzir um mecanismo de resistência de efluxo, semelhante ao mecanismo de BRAs (Mao *et al.*, 2015; Furlan *et al.*, 2020). Esses autores encontraram correlações positivas entre as concentrações de metais pesados presentes no efluente e o enriquecimento de alguns GRAs. Portanto, a restrição no lançamento de antibióticos e metais pesados, bem como a remoção desses microcontaminantes diminuiria a pressão seletiva, e conseqüentemente reduziria a disseminação dos GRAs nas ETEs (Mao *et al.*, 2015). O efluente secundário utilizado no presente estudo foi coletado na região do Quadrilátero Ferrífero (MG), na qual existem inúmeras mineradoras nas proximidades da ETE. Logo, a presença de metais nos efluentes podem favorecer um mecanismo de resistência bacteriana, como por exemplo bombas de efluxo. No entanto, pesquisas adicionais relacionadas a esse assunto são necessárias.

Furlan *et al.* (2020) coletaram amostras de água, solo e sedimentos em locais afetados e não afetados pelo grande desastre ambiental (rompimento de uma barragem de resíduos de minério de ferro) ocorrido na cidade de Brumadinho (MG/Brasil). As concentrações dos metais Mn, Al, Fe e Cu para os locais afetados foram 220, 100, 51 e 6 vezes acima dos padrões recomendados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (resolução CONAMA 357, 2005, para corpos d'água do tipo classe 2). A abundância e a diversidade de GRAs foram maiores nos locais afetados pelo desastre.

6.8 Condições Cromatográficas e de Espectrometria de Massas para Quantificação dos Antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI

As análises quantitativas dos antibióticos selecionados neste estudo foram realizadas por HPLC-ESI-MS/MS, na qual as amostras coletadas foram previamente preparadas por LTPE. Após o processo de otimização, descrito anteriormente na seção 5.13, foi possível obter as seguintes informações: *m/z* do íon precursor de cada antibiótico; os três íons fragmentos mais abundantes, que são utilizados para quantificação e confirmação dos antibióticos selecionados; as melhores condições referentes ao analisador de massas (triploquadrupolo); bem como os tempos de retenção de cada analito (Tabela 6.6). Os antibióticos selecionados foram analisados no modo de ionização positivo (ESI +). A partir das condições instrumentais otimizadas foram obtidos os cromatogramas no modo MRM de cada antibiótico, SMX (Figura 6.23), TMP (Figura 6.24), CEF (Figura 6,25) e ERI (Figura 6.26). Os cromatogramas ilustrados representam o início dos experimentos realizados sob iluminação de cada batelada experimental, na qual os cultivos foram fortificados com 50 µg L⁻¹ de cada antibiótico selecionado.

Tabela 6.6 - Antibióticos de interesse, razões m/z dos íons precursores, transições de cada antibiótico (fragmentação), otimização dos quadropolos (Q1 e Q3) e da célula de colisão utilizando-se o equipamento LCMS-8040.

Analitos	Íon precursor (m/z)	Fragmentação (m/z)	Q1 ^a Pre Bias (V)	CE ^b	Q3 ^c Pre Bias (V)	Tempo de retenção (min)
SMX	254,0	156,1*	-24,0	-16,0	-29,0	2,50
		108,2	-24,0	-25,0	-21,0	
		92,2	-25,0	-26,0	-17,0	
TMP	290,9	230,1*	-30,0	-23,0	-25,0	1,45
		261,1	-30,0	-26,0	-29,0	
		123,1	-30,0	-24,0	-24,0	
CEF	348,1	158,1*	-21,0	-9,0	-17,0	3,74
		174,1	-21,0	-15,0	-19,0	
		106,1	-21,0	-24,0	-20,0	
ERI	734,4	158,1*	-34,0	-33,0	-29,0	5,20
		576,2	-34,0	-21,0	-40,0	
		83,0	-34,0	-49,0	-15,0	

Nota: ^a Q1 = primeiro quadropolo; ^b CE = energia de colisão (*collision energy*); ^c Q3 = segundo quadropolo; * representa os fragmentos com maior intensidade, sendo os mesmos utilizados para quantificação dos analitos.

Figura 6.23 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com $50\mu\text{g L}^{-1}$ de SMX.

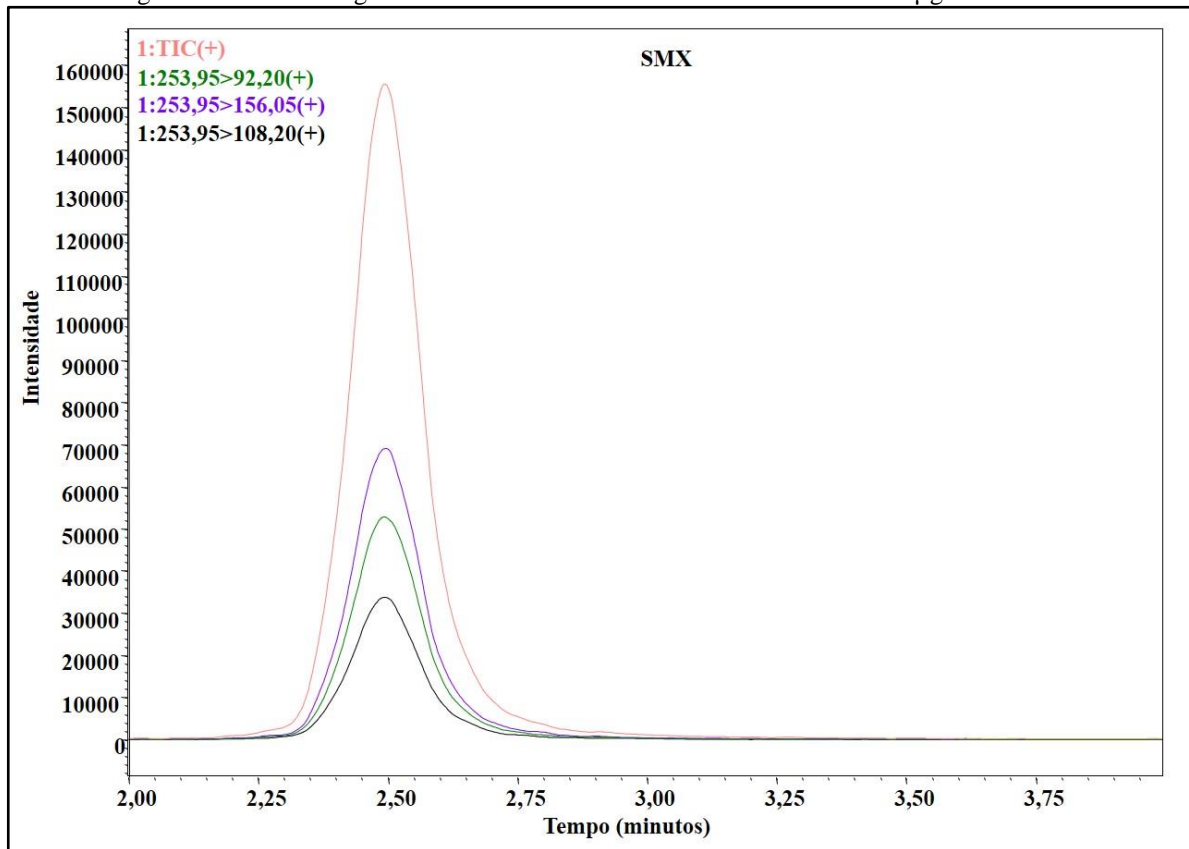


Figura 6.24 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com $50\mu\text{g L}^{-1}$ de TMP.

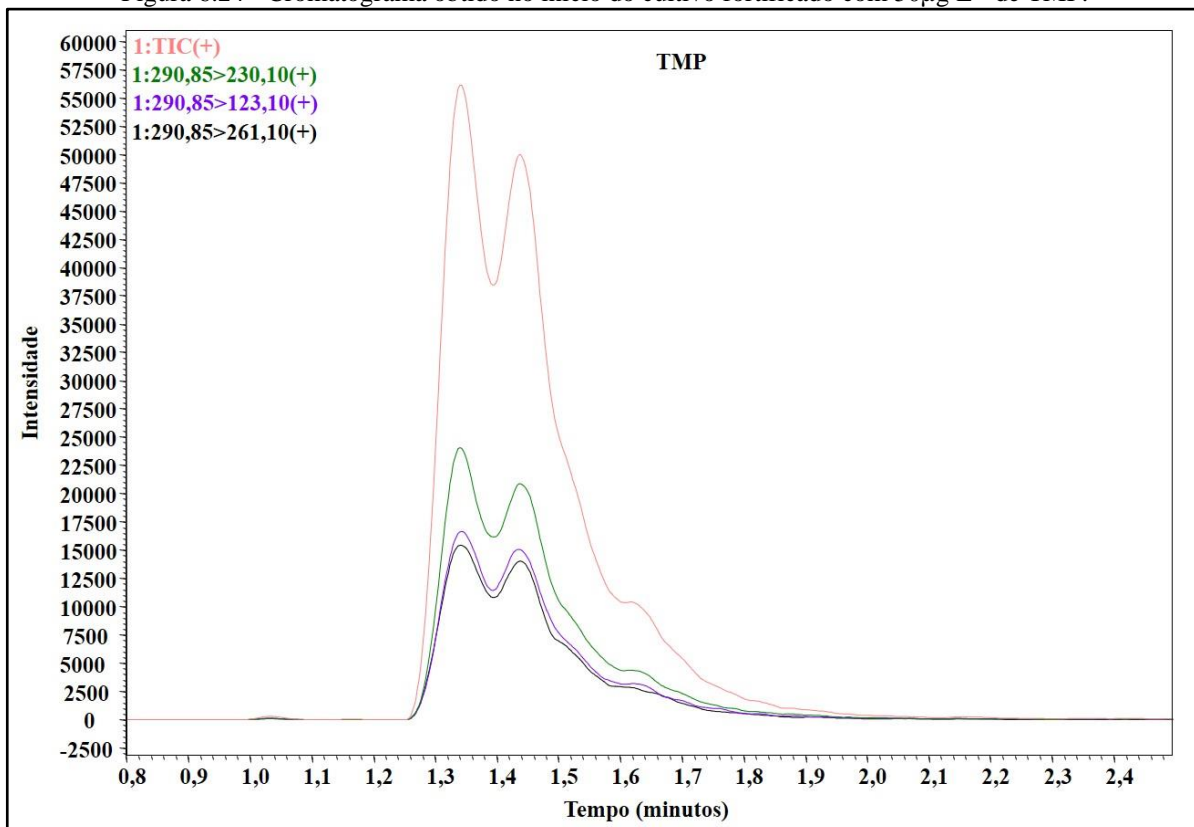


Figura 6.25 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com $50\mu\text{g L}^{-1}$ de CEF.

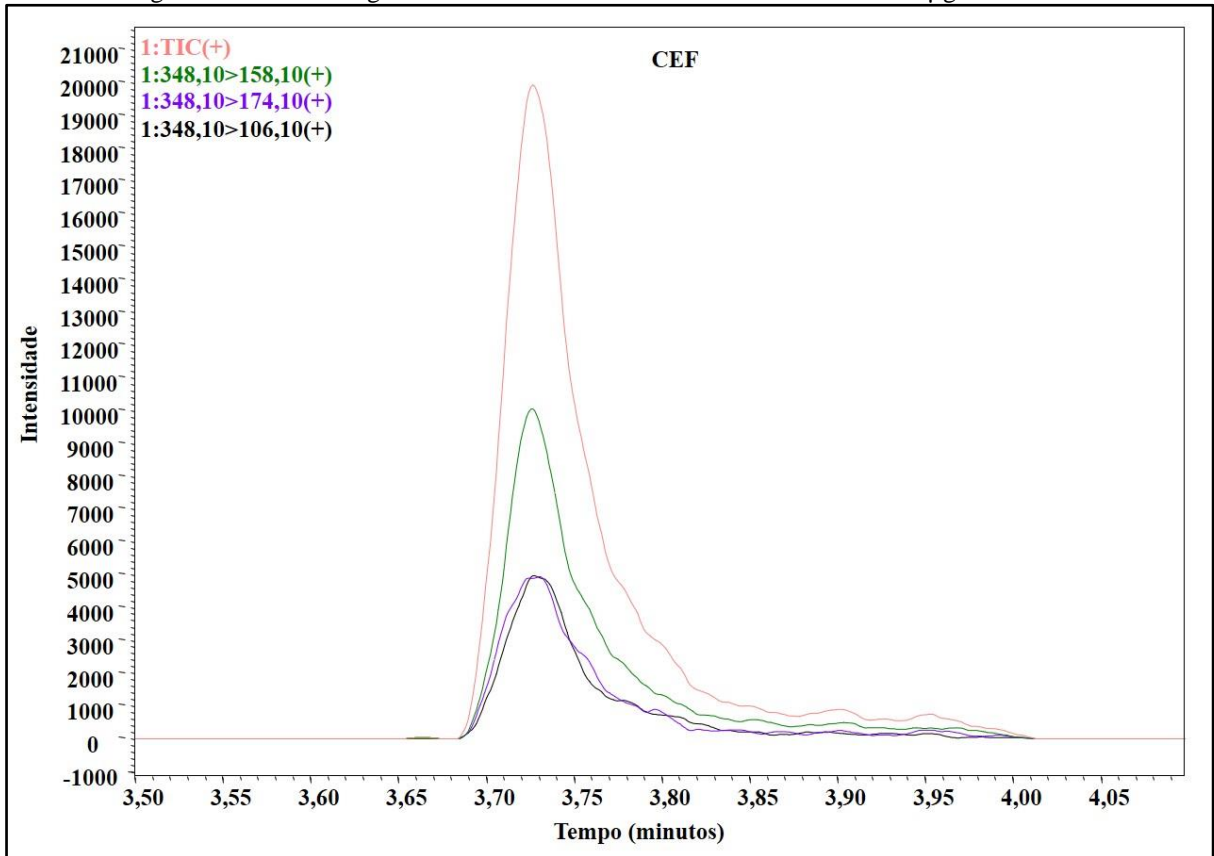
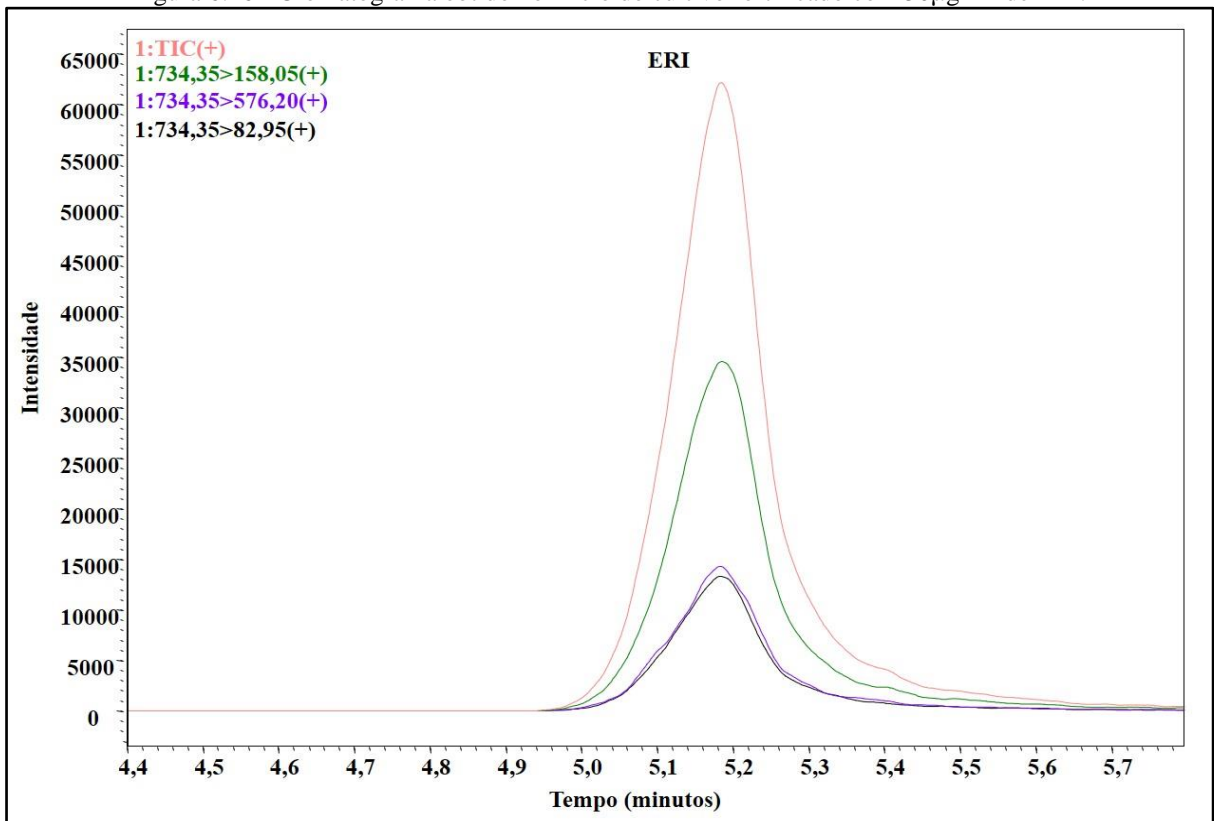


Figura 6.26 - Cromatograma obtido no início do cultivo fortificado com $50\mu\text{g L}^{-1}$ de ERI.



6.9 Recuperação da LTPE para os Antibióticos Estudados

A recuperação dos analitos no processo de preparo das amostras (LTPE) foi realizada no início de cada batelada experimental para quatro tipos distintos de matrizes, são elas: suspensão microalgas-bactérias (efluente da ETE + inóculo contendo o consórcio microalgas-bactérias), efluente da ETE, efluente da ETE esterilizado e água ultrapura. Os resultados das recuperações foram obtidos sem desconsiderar o efeito matriz que foi avaliado pelo método da dupla injeção, previamente descrito na seção 5.13.1. As recuperações (%) para os antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI foram determinadas utilizando-se as equações da reta provenientes das curvas analíticas. As recuperações obtidas foram calculadas pela Equação 5.7, descrita anteriormente na seção 5.12.1. Os valores de recuperação obtidos variaram entre 31,31 e 79,07% para os antibióticos selecionados. Os valores do CV (%) em sua maioria foram menores do que 10%. De acordo com o *guideline* de validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2016), a precisão em termos de repetibilidade pode ser avaliada pelo CV (%). Os valores aceitáveis do CV (%) para amostras contendo concentrações de 100 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ são 15 e 21%, respectivamente. As diferenças nos valores de recuperação estão diretamente associadas às características físico-químicas de cada antibiótico e também com o tipo de matriz. Os valores de recuperação, bem como os valores do CV (%) são apresentados na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 - Índice de recuperação, realizado em triplicata, para LTPE dos antibióticos estudados.

Batelada experimental	matriz	Recuperação média (%)		CV (%)	
SMX	Consórcio*	58,94		7,65	
	Efluente da ETE	65,16		9,46	
TMP	Consórcio	62,96		4,65	
TMP/SMX	Consórcio	TMP	SMX	TMP	SMX
	Efluente da ETE	66,57	62,76	4,87	3,46
	Água ultrapura	65,51	73,94	3,37	7,05
CEF	Consórcio	59,98	79,07	10,66	8,26
	Efluente da ETE	37,49		10,68	
	Água ultrapura	48,13		3,71	
ERI	Consórcio	31,31		0,53	
	Efluente da ETE	55,54		2,96	
	Água ultrapura	64,19		3,86	
ERI	Consórcio	58,55		10,28	
	Efluente da ETE				
	Água ultrapura				

* Suspensão contendo o consórcio microalgas-bactérias em efluente secundário.

Os valores do CV (%) obtidos variaram de 0,53 a 10,68%. Sendo assim, todos os valores encontram-se inferiores a 21%, valor limite de acordo com o *guideline* de validação do INMETRO. Para todos os antibióticos estudados foram obtidas recuperações satisfatórias, pois foi feito apenas uma única extração para cada amostra. Portanto, na presente pesquisa os resultados obtidos apresentam repetibilidade em conformidade com o guia de validação utilizado.

6.10 Quantificação dos Antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI

As curvas analíticas foram determinadas pelo método da dupla injeção, descrito anteriormente na seção 5.13.1. Os níveis de concentração e as razões de área de cada ponto da curva foram obtidos por regressão linear, em que os valores de R^2 foram maiores do que 0,99 para todos os antibióticos estudados. Na Tabela 6.8 são apresentadas as equações da reta obtidas para cada antibiótico, bem como os valores de R^2 .

Tabela 6.8 - Equação da reta e os valores de R² para os antibióticos SMX, TMP, CEF e ERI.

Batelada experimental Analitos	Equação da reta	R ²
SMX	$y = 0,0655x + 0,022$	0,9959
TMP	$y = 0,0718x - 0,0632$	0,9939
SMX	$y = 0,0429x + 0,0012$	0,9918
CEF	$y = 0,1104x + 0,0218$	0,9968
ERI	$y = 0,1057x + 0,0152$	0,9915

A título de ilustração é apresentado na Figura 6.27 a curva analítica para o SMX, as demais curvas encontram-se disponíveis no Apêndice A. Na Tabela 6.9 são apresentados, como exemplo, os valores das áreas referente ao método da dupla injeção obtidos para o SMX. Para os outros antibióticos procedeu-se da mesma forma.

Figura 6.27 - Curva analítica do SMX, obtida pelo método da dupla injeção.

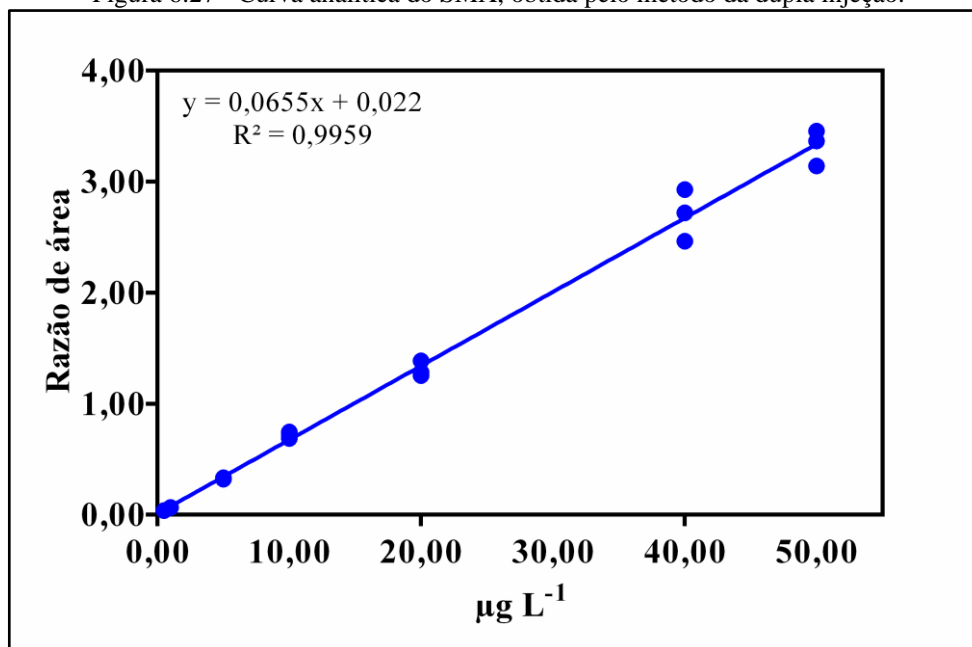


Tabela 6.9 - Curva analítica para o antibiótico SMX feita pelo método da dupla injeção consecutiva.

$\mu\text{g L}^{-1}$	Solvente	Spike	Diferença	Razão	CV (%)
0,5	10038	277849	267811	0,037	
0,5	11164	288882	277718	0,040	11,88
0,5	13019	289648	276629	0,047	
1	18524	299702	281178	0,066	
1	19939	302739	282800	0,071	3,95
1	19665	297820	278155	0,071	
5	92659	379376	286717	0,323	
5	94690	378155	283465	0,334	2,25
5	96008	380486	284478	0,337	
10	200633	492668	292035	0,687	
10	200941	470178	269237	0,746	4,14
10	198384	474003	275619	0,720	
20	380735	683817	303082	1,256	
20	377328	670783	293455	1,286	5,21
20	380337	654692	274355	1,386	
40	772893	1036575	263682	2,931	
40	746715	1049565	302850	2,466	8,62
40	747344	1022034	274690	2,721	
50	945302	1226172	280870	3,366	
50	925350	1219930	294580	3,141	4,87
50	940513	1212694	272181	3,455	

7.0 CONCLUSÕES

A adição de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada antibiótico selecionado ou da mistura TMP/SMX não inibiu o crescimento do consórcio microalgas-bactérias, pelo contrário, para alguns cultivos foram observados um aumento na biomassa, em termos de sólidos suspensos totais. Esse fato pode ter ocorrido devido à inibição ou inativação de bactérias específicas que competiam com as microalgas ou da liberação de nutrientes provenientes da degradação, que estimularam o crescimento algal. Além disso, os cultivos com antibióticos sob iluminação LED apresentaram uma maior concentração de clorofila *a* quando comparado aos respectivos brancos (experimentos realizados nas mesmas condições, mas sem a adição dos antibióticos), indicando uma maior biomassa de microalgas. A biomassa do consórcio microalgas-bactérias também aumentou para os controles realizados no escuro, devido a atividade heterotrófica das microalgas e bactérias presentes no meio. Além disso, os testes sob iluminação foram mais eficientes na remoção dos antibióticos selecionados, quando comparado com os controles realizados no escuro.

A TMP mostrou-se como o antibiótico mais recalcitrante dentre os analisados, seguido pelo SMX. A biodegradação foi o principal mecanismo de remoção para esses antibióticos, na qual o efeito simbiótico, existente entre as microalgas e as bactérias presentes no consórcio, foi responsável por potencializar a biodegradação. A CEF e a ERI apresentaram uma remoção maior do que 90% após quatro e sete dias de cultivo, respectivamente. A biodegradação pelos microrganismos presentes no próprio efluente da ETE foi o principal mecanismo de remoção para a CEF e ERI.

A bioadsorção e bioacumulação não foram mecanismos significantes de remoção para os antibióticos selecionados. A remoção por fotólise, realizada em água ultrapura, foi insignificante para todos os antibióticos estudados. Porém, a matriz complexa utilizada (efluente da ETE esterilizado) influenciou na fotodegradação abiótica dos antibióticos, provavelmente, devido à presença de substâncias fotossensibilizadoras no próprio efluente. No caso específico da ERI, a remoção pelos fatores abióticos pode ter ocorrido tanto pela fotodegradação indireta quanto pela hidrólise, uma vez que esse antibiótico é sensível a faixa de pH do cultivo.

Os valores da constante cinética de remoção (*k*), determinados por um modelo cinético de primeira ordem, foram maiores para os experimentos realizados sob iluminação quando comparado aos experimentos realizados no escuro, principalmente, para os antibióticos mais recalcitrantes (TMP e SMX). Esse fato ocorre devido a atividade autotrófica realizada pelas

microalgas presentes no consórcio. As microalgas liberam O₂, que é essencial para degradação da matéria orgânica (incluem os antibióticos) realizada pelas bactérias heterotróficas presentes no cultivo.

A LTPE, utilizada como preparo de amostras, foi eficiente na extração dos antibióticos selecionados, na qual os valores de recuperação encontrados foram satisfatórios. Além disso, os valores do CV (%) obtidos foram menores que o valor sugerido pelo INMETRO, indicando que as análises foram precisas, em termos de repetibilidade das extrações.

As abundâncias absolutas e relativas associadas ao gene de resistência *sulI* aumentou para os cultivos fortificados com SMX e com a mistura TMP/SMX. Para os cultivos fortificados com a CEF houve uma diminuição na abundância absoluta do gene *bla_{TEM}*, no entanto a abundância relativa aumentou ligeiramente. As abundâncias associadas ao gene *ermB* diminuíram após o período de cultivo. Sendo assim, as concentrações residuais dos diferentes antibióticos estudados, presentes no meio, influenciaram na disseminação dos genes de resistência. O SMX foi menos degradado quando comparado aos antibióticos CEF e ERI. Por isso sugere-se que a sua maior concentração residual, presente no cultivo, resultou na proliferação dos genes de resistência.

O presente estudo representa um avanço no que diz respeito ao uso do consórcio microalgas-bactérias para degradação de antibióticos em matrizes aquosas complexas, uma vez que a maioria dos estudos reportados na literatura são referentes ao cultivo de espécies isoladas de microalgas em matrizes aquosas simples. Os resultados alcançados são promissores no que se refere à remoção dos antibióticos não degradados anteriormente nas unidades da estação de tratamento, pois refletem a atividade de um consórcio natural cultivado no efluente secundário. Esse tipo de matriz complexa contém inúmeras substâncias que podem causar interferência na remoção dos analitos de interesse. No entanto, as interferências não foram desconsideradas, aproximando do que realmente aconteceria em um sistema real de tratamento terciário.

PESQUISAS FUTURAS

- Investigar o papel dos principais microrganismos identificados no consórcio microalgas-bactérias na remoção dos antibióticos estudados, para se ter uma melhor compreensão do sistema utilizado. Além disso, identificar os principais subprodutos provenientes da biodegradação e avaliar a toxicidade dos mesmos;
- Estudar a influência das substâncias fotossensibilizadoras (presentes no próprio efluente secundário) na remoção dos antibióticos selecionados, principalmente, para a ERI, uma vez que esse antibiótico é instável na referida faixa de pH de cultivo. Assim, seria possível determinar a contribuição dos fotossensibilizadores na remoção dos antibióticos, bem como a parcela removida pela hidrólise;
- Estudar a remoção dos antibióticos selecionados em escalas superiores, além de avaliar a remoção dos antibióticos em fotobiorreatores alimentados continuamente. Além disso, determinar a cinética de remoção para um mix dos antibióticos selecionados, visto que nos efluentes reais normalmente são encontrados uma gama de antibióticos e outros microcontaminantes.

REFERÊNCIAS

AFONSO-OLIVARES, C.; ČADKOVÁ, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. *et al.* Simplified solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography tandem–mass spectrometry for multiresidue assessment of pharmaceutical compounds in environmental liquid samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1487, p. 54-63, 2017.

AHMED, M. B.; ZHOU, J. L.; NGO, H. H.; GUO, W. *et al.* Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: a critical review. *Journal of hazardous materials*, v. 323, p. 274-298, 2017.

ANDRADE, P. D.; DA SILVA, J. L. G.; CALDAS, E. D. Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid–liquid extraction with low temperature purification (LLE–LTP). *Journal of Chromatography A*, v. 1304, p. 61-68, 2013.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANTIMICROBIANOS - BASES TEÓRICAS E USO CLÍNICO - Cefalosporinas.** 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opus_web/modulo1/cefaloporinas.htm. Acesso em: 05/07/2020.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Produtos Controlados.** 2011. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/produtos_controlados. Acesso em: 23 outubro de 2017.

AQUINO, S. F. d.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. d. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. v. 18, p. 187-204, 2013.

BAI, X.; ACHARYA, K. Removal of trimethoprim, sulfamethoxazole, and triclosan by the green alga *Nannochloris* sp. *Journal of hazardous materials*, v. 315, p. 70-75, 2016.

BAI, X.; ACHARYA, K. Algae-mediated removal of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from Lake Mead water. *Science of the Total Environment*, v. 581, p. 734-740, 2017.

BARROS, A. L. C. **Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para a análise de agrotóxicos via UHPLC-ESI-MS/MS em águas superficiais em Ouro Branco/MG.** 2014. 133 f. (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (ProAmb), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

BARROS, A. L. C.; DE ABREU, C. G.; DA CUNHA, C. C. R. F.; DA SILVA RODRIGUES, D. A. *et al.* Method development for simultaneous determination of polar and nonpolar pesticides in surface water by low-temperature partitioning extraction (LTPE) followed by HPLC-ESI-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 31, p. 31609-31622, 2019.

BARROS, A. L. C.; SCHMIDT, F. F.; DE AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. d. C. F. Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 20, p. 19962-19974, 2018.

BBOSA, G. S.; MWEBAZA, N.; ODDA, J.; KYEGOMBE, D. B. *et al.* Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, v. 6, n. 05, p. 410, 2014.

BEBELL, L. M.; MUIRU, A. N. Antibiotic use and emerging resistance: how can resource-limited countries turn the tide? *Global Heart*, v. 9, n. 3, p. 347-358, 2014.

BEHRENS, P. W. Photobioreactors and fermentors: the light and dark sides of growing algae. *Algal Culturing Techniques*, v. p. 189-204, 2005.

BEN, W.; QIANG, Z.; ADAMS, C.; ZHANG, H. *et al.* Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1202, n. 2, p. 173-180, 2008.

BENEDETTI, B.; MAJONE, M.; CAVALIERE, C.; MONTONE, C. M. *et al.* Determination of multi-class emerging contaminants in sludge and recovery materials from waste water treatment plants: Development of a modified QuEChERS method coupled to LC–MS/MS. *Microchemical Journal*, v. 155, p. 104732, 2020.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BROOKE, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, v. 25, n. 1, p. 2-41, 2012.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 19, p. 360-369, 2013.

CARVALHO, I. T.; SANTOS, L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, v. 94, p. 736-757, 2016.

CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D. M.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, v. 852, n. 1-2, p. 22-34, 2007.

CHEN, B.; LIANG, X.; NIE, X.; HUANG, X. *et al.* The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China. *Journal of Hazardous materials*, v. 282, p. 61-67, 2015.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHRISTOFF, A. P.; SEREIA, A. F. R.; BOBERG, D.; MORAES, R. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies*, v. 25, p. 2017.

COLLINS C. H.; BRAGA G. L.; S., B. P. **Fundamentos de Cromatografia**. Editorada Unicamp, 2006. 453 p.

COURTENS, E. N.; SPIECK, E.; VILCHEZ-VARGAS, R.; BODÉ, S. *et al.* A robust nitrifying community in a bioreactor at 50 C opens up the path for thermophilic nitrogen removal. *The ISME journal*, v. 10, n. 9, p. 2293-2303, 2016.

CRF-SP. **Conselho Regional de Farmácia de São Paulo. Farmácia não é um simples comércio, Fascículo VI, Antibióticos. Projeto Farmácia estabelecimento de saúde.**, 2011. Disponível em: <http://www.crfsp.org.br/component/phocadownload/category/22-fasciculos.html?download=92:fasciculo-vi-antibioticos>. Acesso em: Março de 2017.

DE LA CRUZ QUIROZ, R.; BARCELÓ, D.; IQBAL, H.; PARRA-SALDIVAR, R. Algal-based removal strategies for hazardous contaminants from the environment—a review. *Sci. Total Environ*, v. 665, p. 358-366, 2019.

DE WILT, A.; BUTKOVSKYI, A.; TUANTET, K.; LEAL, L. H. *et al.* Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal of hazardous materials*, v. 304, p. 84-92, 2016.

DENG, W.; LI, N.; ZHENG, H.; LIN, H. Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in Hong Kong. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 125, p. 121-127, 2016.

DENG, X.-Y.; CHENG, J.; HU, X.-L.; WANG, L. *et al.* Biological effects of TiO₂ and CeO₂ nanoparticles on the growth, photosynthetic activity, and cellular components of a marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Science of The Total Environment*, v. 575, p. 87-96, 2017.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. d. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DINH, Q.; MOREAU-GUIGON, E.; LABADIE, P.; ALLIOT, F. *et al.* Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. *Science of the Total Environment*, v. 575, p. 758-766, 2017.

DINH, Q. T.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; EURIN, J. *et al.* Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta*, v. 85, n. 3, p. 1238-1245, 2011.

DONG, H.; YUAN, X.; WANG, W.; QIANG, Z. Occurrence and removal of antibiotics in ecological and conventional wastewater treatment processes: a field study. *Journal of Environmental Management*, v. 178, p. 11-19, 2016.

DRUGBANK. **Database Source**. 2020. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00440>. Acesso em: 17 de abr. de 2020.

DU, Y.; ZHANG, S.; GUO, R.; CHEN, J. Understanding the algal contribution in combined UV-algae treatment to remove antibiotic cefradine. *RSC Advances*, v. 5, n. 74, p. 59953-59959, 2015.

ECDC. **European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC**. , 2018. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/home>. Acesso em: Maio de 2018.

EIO, E. J.; KAWAI, M.; NIWA, C.; ITO, M. *et al.* Biodegradation of bisphenol A by an algal-bacterial system. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 19, p. 15145-15153, 2015.

FALCONE-DIAS, M. F.; VAZ-MOREIRA, I.; MANAIA, C. M. Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water research*, v. 46, n. 11, p. 3612-3622, 2012.

FAN, C.; HE, J. Proliferation of antibiotic resistance genes in microbial consortia of sequencing batch reactors (SBRs) upon exposure to trace erythromycin or erythromycin-H₂O. *Water research*, v. 45, n. 10, p. 3098-3106, 2011.

FERRANDO, L.; MATAMOROS, V. Attenuation of nitrates, antibiotics and pesticides from groundwater using immobilised microalgae-based systems. *Science of The Total Environment*, v. 703, p. 134740, 2020.

FERRIS, M.; MUYZER, G.; WARD, D. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 2, p. 340-346, 1996.

FUENTES, J. L.; GARBAYO, I.; CUARESMA, M.; MONTERO, Z. *et al.* Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs*, v. 14, n. 5, p. 100, 2016.

FURLAN, J. P. R.; DOS SANTOS, L. D. R.; MORETTO, J. A. S.; RAMOS, M. S. *et al.* Occurrence and abundance of clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental samples after the Brumadinho dam disaster, Brazil. *Science of The Total Environment*, v. 726, p. 138100, 2020.

GOMES, R. d. P.; PENA, C. B.; REZENDE, J.; COUTRIM, M. X. *et al.* Validation of a new high-throughput method to determine urinary S-phenylmercapturic acid using low-temperature partitioning extraction and ultra high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of separation science*, v. 40, n. 2, p. 550-557, 2017.

GOMES, R. P. **Métodos de extração com partição a baixa temperatura para a determinação de marcadores biológicos de exposição ao benzeno, em urina, por UHPLC-MS/MS.** 2016. 176 f. Mestrado em Engenharia Ambiental - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (ProAmb). Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, v. 24, p. 403-415, 2017.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, J. H. *et al.* Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. *Analytica chimica acta*, v. 671, n. 1, p. 41-47, 2010.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; PAULA, W. X. d.; QUEIROZ, J. H. d. *et al.* Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 6, p. 1154-1165, 2012.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1292, p. 173-188, 2013.

GROSS, M. Antibiotics in Crisis. Feature. Elsevier. 23 2013.

GULKOWSKA, A.; LEUNG, H. W.; SO, M. K.; TANIYASU, S. *et al.* Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research*, v. 42, n. 1, p. 395-403, 2008.

GUO, R.; CHEN, J. Application of alga-activated sludge combined system (AASCS) as a novel treatment to remove cephalosporins. *Chemical Engineering Journal*, v. 260, p. 550-556, 2015.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental.** Bookman, 2009. 8577804607.

HU, F. Y.; HE, L. M.; YANG, J. W.; BIAN, K. *et al.* Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 949, p. 79-86, 2014.

HU, Y.; JIANG, L.; ZHANG, T.; JIN, L. *et al.* Occurrence and removal of sulfonamide antibiotics and antibiotic resistance genes in conventional and advanced drinking water treatment processes. *Journal of hazardous materials*, v. 360, p. 364-372, 2018.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. DOQ-CGCRE-008.** 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 24/07/2020.

JAÉN-GIL, A.; HOM-DIAZ, A.; LLORCA, M.; VICENT, T. *et al.* An automated on-line turbulent flow liquid-chromatography technology coupled to a high resolution mass spectrometer LTQ-Orbitrap for suspect screening of antibiotic transformation products during microalgae wastewater treatment. *Journal of Chromatography A*, v. 1568, p. 57-68, 2018.

KANDA, R.; GLENDINNING, R. Mass spectrometry for environmental and wastewater monitoring. *Spectroscopy Europe*, v. 23, n. 5, p. 14, 2011.

KIKI, C.; RASHID, A.; WANG, Y.; LI, Y. *et al.* Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics, identification of transformation products and pathways. *Journal of Hazardous Materials*, v. 387, p. 121985, 2020.

KIM, H.; HONG, Y.; PARK, J.-e.; SHARMA, V. K. *et al.* Sulfonamides and tetracyclines in livestock wastewater. *Chemosphere*, v. 91, n. 7, p. 888-894, 2013.

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 52, p. 1834-1846, 2015.

KOUNOSU, A.; MURASE, K.; YOSHIDA, A.; MARUYAMA, H. *et al.* Improved 18S and 28S rDNA primer sets for NGS-based parasite detection. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

KRZEMINSKI, P.; TOMEI, M. C.; KARAOLIA, P.; LANGENHOFF, A. *et al.* Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: A review. *Science of the Total Environment*, v. 648, p. 1052-1081, 2019.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A. *et al.* Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, v. 28, n. 7, p. 371-380, 2010.

KURADE, M. B.; XIONG, J.-Q.; GOVINDWAR, S. P.; ROH, H.-S. *et al.* Uptake and biodegradation of emerging contaminant sulfamethoxazole from aqueous phase using *Ipomoea aquatica*. *Chemosphere*, v. 225, p. 696-704, 2019.

LACEY, C.; MCMAHON, G.; BONES, J.; BARRON, L. *et al.* An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta*, v. 75, n. 4, p. 1089-1097, 2008.

LAGESSON, A.; FAHLMAN, J.; BRODIN, T.; FICK, J. *et al.* Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web-Insights from a field experiment. *Science of The Total Environment*, v. 568, p. 208-215, 2016.

LARCHER, S.; YARGEAU, V. Biodegradation of sulfamethoxazole: current knowledge and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 96, n. 2, p. 309-318, 2012.

LE-MINH, N.; KHAN, S.; DREWES, J.; STUETZ, R. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water research*, v. 44, n. 15, p. 4295-4323, 2010.

- LENG, L.; WEI, L.; XIONG, Q.; XU, S. *et al.* Use of microalgae-based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. *Chemosphere*, v. p. 124680, 2019.
- LI, B.; ZHANG, T.; XU, Z.; FANG, H. H. P. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 645, n. 1, p. 64-72, 2009.
- LI, N.; SHENG, G.-P.; LU, Y.-Z.; ZENG, R. J. *et al.* Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. *Water research*, v. 111, p. 204-212, 2017.
- LIANG, X.; GUAN, F.; CHEN, B.; LUO, P. *et al.* Spatial and seasonal variations of antibiotic resistance genes and antibiotics in the surface waters of Poyang Lake in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 196, p. 110543, 2020.
- LIMA, B. D. **Otimização e validação de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura de microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto e análise por CG-EM.** 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (ProAmb), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).
- LIU, H.; LIN, T.; MAO, J.; LU, H. *et al.* Paclitaxel residue determination in potato and soil using low temperature partition extraction and ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of analytical methods in chemistry*, v. 2015, p. 2015a.
- LIU, J.; CHEN, F.; HUANG, J. **Microalgae as feedstocks for biodiesel production.** INTECH Open Access Publisher, 2011. 9533077131.
- LIU, J.; WU, Y.; WU, C.; MUYLAERT, K. *et al.* Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. *Bioresource Technology*, v. 241, p. 1127-1137, 2017.
- LIU, Q.; LI, M.; LIU, X.; ZHANG, Q. *et al.* Removal of sulfamethoxazole and trimethoprim from reclaimed water and the biodegradation mechanism. *Frontiers of environmental science & engineering*, v. 12, n. 6, p. 6, 2018.
- LIU, Y.; WANG, F.; CHEN, X.; ZHANG, J. *et al.* Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 111, p. 138-145, 2015b.
- LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, n. 3, p. 385-393, 2011.
- LOPES, R. P.; AUGUSTI, D. V.; DE SOUZA, L. F.; SANTOS, F. A. *et al.* Development and validation (according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. *Analytical Methods*, v. 3, n. 3, p. 606-613, 2011.
- LÓPEZ-SERNA, R.; GARCÍA, D.; BOLADO, S.; JIMÉNEZ, J. J. *et al.* Photobioreactors based on microalgae-bacteria and purple phototrophic bacteria consortia: A promising technology to reduce the load of veterinary drugs from piggery wastewater. *Science of The Total Environment*, v. 692, p. 259-266, 2019.
- MAO, D.; YU, S.; RYSZ, M.; LUO, Y. *et al.* Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water research*, v. 85, p. 458-466, 2015.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, v. 1040, n. 2, p. 259-272, 2004.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATAMOROS, V.; BAYONA, J. M. Behavior of emerging pollutants in constructed wetlands. In: **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**: Springer, 2008. p. 199-217.

MCCLURE, E. L.; WONG, C. S. Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v. 1169, n. 1, p. 53-62, 2007.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, v. p. 188-197, 2009.

MENG, L.; WANG, J.; LI, X. Insight into effect of high-level cephalixin on fate and driver mechanism of antibiotics resistance genes in antibiotic wastewater treatment system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 201, p. 110739, 2020.

MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 203-218, 2000.

NASCENTES, C. C.; AUGUSTI, R.; AFONSO, R. J. d. C. F. Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and LC-HRMS. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 2012, p. 2012.

NEVES E CASTRO, P. B.; DA SILVA RODRIGUES, D. A.; ROESER, H. M. P.; DA FONSECA SANTIAGO, A. *et al.* Antibiotic consumption in developing countries defies global commitments: an overview on Brazilian growth in consumption. *Environmental Science and Pollution Research*, v. p. 2020/04/07 2020.

NÖDLER, K.; LICHA, T.; BESTER, K.; SAUTER, M. Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 42, p. 6511-6521, 2010.

NORVILL, Z. N.; SHILTON, A.; GUIEYSSE, B. Emerging contaminant degradation and removal in algal wastewater treatment ponds: Identifying the research gaps. *Journal of hazardous materials*, v. 313, p. 291-309, 2016.

NOVO, A.; ANDRÉ, S.; VIANA, P.; NUNES, O. C. *et al.* Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, v. 47, n. 5, p. 1875-1887, 2013.

NUSH. Netherlands Norm-NEN 6520. Water: Spectrophotometric Determination of Chlorophyll a Content. 1981.

OECD. **Organization for Economic Co-operation and Development.**, 2020. Disponível em: <https://www.oecd.org/els/health-systems/antimicrobial-resistance.htm>. Acesso em: 04/17/2020.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Guidelines for testing of chemicals simulation teste-Aerobic sewage treatment. Technical Report. v. p., 1996.

- OSWALD, W. J.; GOTAAS, H. B. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.*, v. 122, n. 1, p. 73-105, 1957.
- OZKAN, A.; KINNEY, K.; KATZ, L.; BERBEROGLU, H. Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresource technology*, v. 114, p. 542-548, 2012.
- PAL, A.; GIN, K. Y.-H.; LIN, A. Y.-C.; REINHARD, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 24, p. 6062-6069, 2010.
- PALIWAL, C.; PANCHA, I.; GHOSH, T.; MAURYA, R. *et al.* Selective carotenoid accumulation by varying nutrient media and salinity in *Synechocystis* sp. CCNM 2501. *Bioresource technology*, v. 197, p. 363-368, 2015.
- PAN, C.-G.; PENG, F.-J.; YING, G.-G. Removal, biotransformation and toxicity variations of climbazole by freshwater algae *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Pollution*, v. 240, p. 534-540, 2018.
- PANDEY, A.; LEE, D.-J.; CHISTI, Y.; SOCCOL, C. R. **Biofuels from algae**. Newnes, 2013. 0444595821.
- PARK, J.; CRAGGS, R.; SHILTON, A. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 35-42, 2011.
- PARK, K. C.; WHITNEY, C.; MCNICHOL, J. C.; DICKINSON, K. E. *et al.* Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 3, p. 339-348, 2012.
- PARK, Y.; JE, K.-W.; LEE, K.; JUNG, S.-E. *et al.* Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia*, v. 598, n. 1, p. 219-228, 2008.
- PÉREZ, S.; EICHHORN, P.; AGA, D. S. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 24, n. 6, p. 1361-1367, 2005.
- PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, v. 32, p. 987-995, 2009.
- PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 17-25, 2011.
- POMATI, F.; NETTING, A. G.; CALAMARI, D.; NEILAN, B. A. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, v. 67, n. 4, p. 387-396, 2004.
- POWELL, N.; SHILTON, A.; CHISTI, Y.; PRATT, S. Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*, v. 43, n. 17, p. 4207-4213, 2009.
- PUGAJEVA, I.; RUSKO, J.; PERKONS, I.; LUNDANES, E. *et al.* Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 133, p. 64-74, 2017.

QI, C.; LIU, X.; LIN, C.; ZHANG, X. *et al.* Degradation of sulfamethoxazole by microwave-activated persulfate: kinetics, mechanism and acute toxicity. *Chemical Engineering Journal*, v. 249, p. 6-14, 2014.

QIANG, H.; ZARMI, Y.; RICHMOND, A. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *European Journal of Phycology*, v. 33, n. 2, p. 165-171, 1998.

QUIJANO, G.; ARCILA, J. S.; BUITRÓN, G. Microalgal-bacterial aggregates: applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 6, p. 772-781, 2017.

RAMANAN, R.; KIM, B.-H.; CHO, D.-H.; OH, H.-M. *et al.* Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, v. 34, n. 1, p. 14-29, 2016.

RAMSUNDAR, P.; GULDHE, A.; SINGH, P.; BUX, F. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. *Bioresource technology*, v. 227, p. 82-92, 2017.

RAO, R. N.; VENKATESWARLU, N.; NARSIMHA, R. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1187, n. 1, p. 151-164, 2008.

REINHOLD, D.; VISHWANATHAN, S.; PARK, J. J.; OH, D. *et al.* Assessment of plant-driven removal of emerging organic pollutants by duckweed. *Chemosphere*, v. 80, n. 7, p. 687-692, 2010.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, v. 88, n. 1, p. 546-582, 2015.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. John Wiley & Sons, 2008. 1405172495.

RODRIGUES, K. L. T. R. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação Simultânea de Microcontaminantes Emergentes em Águas Superficiais por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas**. . 2012. 159 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (ProAmb), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B. *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water research*, v. 69, p. 234-242, 2015.

ROSSMANN, J.; SCHUBERT, S.; GURKE, R.; OERTEL, R. *et al.* Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 969, p. 162-170, 2014.

RYAN, C. C.; TAN, D. T.; ARNOLD, W. A. Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. *Water research*, v. 45, n. 3, p. 1280-1286, 2011.

RYAN, M. P.; PEMBROKE, J. T. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 480-493, 2018.

SALIM, S.; BOSMA, R.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, v. 23, n. 5, p. 849-855, 2011.

SANTOS, I.; DE SOUSA, R.; SANTANA, G. Princípios da antibioticoterapia em medicina veterinária. *Boletim Agropecuário, Lavras*, v. n. 38, p. 2006.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake dissolved inorganic carbon. *Plant and cell physiology*, v. 34, n. 5, p. 649-657, 1993.

SHRIWASTAV, A.; ASHOK, V.; THOMAS, J.; BOSE, P. A comprehensive mechanistic model for simulating algal-bacterial growth dynamics in photobioreactors. *Bioresource technology*, v. 247, p. 640-651, 2018.

SIEDLEWICZ, G.; BORECKA, M.; BIAŁK-BIELIŃSKA, A.; SIKORA, K. *et al.* Determination of antibiotic residues in southern Baltic Sea sediments using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Oceanologia*, v. 58, n. 3, p. 221-234, 2016.

SILVA, F.; DE SOUZA, R.; DE CASTRO, F.; ARAÚJO, A. Prospectus of waste stabilization ponds in Ceará, Northeast Brazil. *Water Science and Technology*, v. 63, n. 6, p. 1265-1270, 2011.

SILVA, L. M. L. **Avaliação de fotobiorreatores iluminados por diodos emissores de luz para o tratamento de efluentes domésticos.** 2016. 176 f. Dissertação (Mestrado) - Program de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (ProAmb), Universidade Federal de Ouro Preto.

SILVA, L. M. L.; DA FONSECA SANTIAGO, A.; ZUCCARI DA SILVA, G. M.; VASSOLER, F. *et al.* Tratamento de efluentes em fotobiorreatores iluminados por diodos emissores de luz (LEDs) de baixa intensidade luminosa. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, v. 10, n. 1, p. 87-103, 2017.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P. *et al.* Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 35, n. 10, p. 2052-2056, 2012.

SIMSEK, H.; KASI, M.; OHM, J.-B.; MURTHY, S. *et al.* Impact of solids retention time on dissolved organic nitrogen and its biodegradability in treated wastewater. *Water research*, v. 92, p. 44-51, 2016.

SONG, C.; WEI, Y.; QIU, Y.; QI, Y. *et al.* Biodegradability and mechanism of florfenicol via *Chlorella* sp. UTEX1602 and L38: Experimental study. *Bioresource technology*, v. 272, p. 529-534, 2019.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, v. 1058, n. 1-2, p. 61-66, 2004.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 6, p. 4316-4342, 2012.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water research*, v. 44, n. 10, p. 3214-3224, 2010.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K. *et al.* Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment international*, v. 51, p. 59-72, 2013.

SUTHERLAND, D. L.; RALPH, P. J. Microalgal bioremediation of emerging contaminants- Opportunities and challenges. *Water research*, v. p. 114921, 2019.

- SZEKERES, E.; BARICZ, A.; CHIRIAC, C. M.; FARKAS, A. *et al.* Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. *Environmental Pollution*, v. 225, p. 304-315, 2017.
- TAO, C.-W.; HSU, B.-M.; JI, W.-T.; HSU, T.-K. *et al.* Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *Science of the Total Environment*, v. 496, p. 116-121, 2014.
- TATE, J. J.; GUTIERREZ-WING, M. T.; RUSCH, K. A.; BENTON, M. G. The effects of plant growth substances and mixed cultures on growth and metabolite production of green algae *Chlorella* sp.: a review. *Journal of plant growth regulation*, v. 32, n. 2, p. 417-428, 2013.
- TAYLOR, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography - electrospray - tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.
- TEIXEIRA, J. R.; GRANEK, E. F. Effects of environmentally-relevant antibiotic mixtures on marine microalgal growth. *Science of The Total Environment*, v. 580, p. 43-49, 2017.
- TLILI, I.; CARIA, G.; OUDDANE, B.; GHORBEL-ABID, I. *et al.* Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application. *Science of The Total Environment*, v. 563, p. 424-433, 2016.
- TRAN, N. H.; CHEN, H.; VAN DO, T.; REINHARD, M. *et al.* Simultaneous analysis of multiple classes of antimicrobials in environmental water samples using SPE coupled with UHPLC-ESI-MS/MS and isotope dilution. *Talanta*, v. 159, p. 163-173, 2016.
- TSENG, S.-P.; TSAI, W.-C.; LIANG, C.-Y.; LIN, Y.-S. *et al.* The contribution of antibiotic resistance mechanisms in clinical *Burkholderia cepacia* complex isolates: an emphasis on efflux pump activity. *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. e104986, 2014.
- US-EPA. **United States Environmental Protection Agency.**, 2014. Disponível em: <https://www.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act>. Acesso em: Outubro de 2017.
- VAN BOECKEL, T. P.; GANDRA, S.; ASHOK, A.; CAUDRON, Q. *et al.* Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 8, p. 742-750, 2014/08/01/ 2014.
- VAN DEN HENDE, S.; VERVAEREN, H.; SAVEYN, H.; MAES, G. *et al.* Microalgal bacterial floc properties are improved by a balanced inorganic/organic carbon ratio. *Biotechnology and bioengineering*, v. 108, n. 3, p. 549-558, 2011.
- VAN NUIJS, A. L.; TARCOMNICU, I.; COVACI, A. Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 35, p. 5964-5974, 2011.
- VELOSO, V.; REIS, A.; GOUVEIA, L.; FERNANDES, H. *et al.* Lipid production by *Phaeodactylum tricorutum*. *Bioresource technology*, v. 38, n. 2-3, p. 115-119, 1991.
- VO, H. N. P.; NGO, H. H.; GUO, W.; LIU, Y. *et al.* Identification of the pollutants' removal and mechanism by microalgae in saline wastewater. *Bioresource technology*, v. 275, p. 44-52, 2019.

VON SPERLING, M.; CARAUCCI FILHO, B.; MONTEGGI, L.; PIVELLI, R. Remoção de nutrientes em sistemas naturais. *Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção*, v. p. 2009.

WANG, J.; WANG, S. Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 102, n. 8, p. 3573-3582, 2018a.

WANG, S.; WANG, J. Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by a novel strain *Acinetobacter* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 102, n. 1, p. 425-432, 2018b.

WANG, Y.; HO, S.-H.; CHENG, C.-L.; GUO, W.-Q. *et al.* Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 222, p. 485-497, 2016.

WANG, Y.; LIU, J.; KANG, D.; WU, C. *et al.* Removal of pharmaceuticals and personal care products from wastewater using algae-based technologies: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 16, n. 4, p. 717-735, 2017.

WATKINSON, A.; MURBY, E.; COSTANZO, S. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, v. 41, n. 18, p. 4164-4176, 2007.

WEON, H.-Y.; NOH, H.-J.; SON, J.-A.; JANG, H. B. *et al.* *Rudanella lutea* gen. nov., sp. nov., isolated from an air sample in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 2, p. 474-478, 2008.

WHO. **World Health Organization - Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance.** <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=15&codcch=870>, 2014. ISSN 9241564741.

WILKINSON, J.; HOODA, P. S.; BARKER, J.; BARTON, S. *et al.* Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution*, v. 231, p. 954-970, 2017.

WOJCIECHOWSKI, J.; STRAUBE, A.; CAVALCANTE, K. P.; MIRANDA, F. E. Microalgas. *Isolamento e Cultivo de Microalgas*. v. p. 91, 2013.

WU, D.-L.; ZHANG, M.; HE, L.-X.; ZOU, H.-Y. *et al.* Contamination profile of antibiotic resistance genes in ground water in comparison with surface water. *Science of The Total Environment*, v. 715, p. 136975, 2020.

XIE, B.; TANG, X.; NG, H. Y.; DENG, S. *et al.* Biological sulfamethoxazole degradation along with anaerobically digested centrate treatment by immobilized microalgal-bacterial consortium: Performance, mechanism and shifts in bacterial and microalgal communities. *Chemical Engineering Journal*, v. 388, p. 124217, 2020.

XIONG, J.-Q.; GOVINDWAR, S.; KURADE, M. B.; PAENG, K.-J. *et al.* Toxicity of sulfamethazine and sulfamethoxazole and their removal by a green microalga, *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, v. 218, p. 551-558, 2019a.

XIONG, J.-Q.; KIM, S.-J.; KURADE, M. B.; GOVINDWAR, S. *et al.* Combined effects of sulfamethazine and sulfamethoxazole on a freshwater microalga, *Scenedesmus obliquus*: toxicity, biodegradation, and metabolic fate. *Journal of hazardous materials*, v. 370, p. 138-146, 2019b.

XIONG, J.-Q.; KURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A.; JI, M.-K. *et al.* Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresource technology*, v. 205, p. 183-190, 2016a.

XIONG, J.-Q.; KURADE, M. B.; JEON, B.-H. Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga, *Chlorella vulgaris*. *Chemical Engineering Journal*, v. 313, p. 1251-1257, 2016b.

XIONG, J.-Q.; KURADE, M. B.; JEON, B.-H. Can microalgae remove pharmaceutical contaminants from water? *Trends in Biotechnology*, v. p. 2017a.

XIONG, J.-Q.; KURADE, M. B.; JEON, B.-H. Ecotoxicological effects of enrofloxacin and its removal by monoculture of microalgal species and their consortium. *Environmental Pollution*, v. 226, p. 486-493, 2017b.

XIONG, J.-Q.; KURADE, M. B.; KIM, J. R.; ROH, H.-S. *et al.* Ciprofloxacin toxicity and its cometabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of hazardous materials*, v. 323, p. 212-219, 2017c.

XIONG, J.-Q.; RU, S.; ZHANG, Q.; JANG, M. *et al.* Insights into the effect of cerium oxide nanoparticle on microalgal degradation of sulfonamides. *Bioresource Technology*, v. p. 123452, 2020.

XU, Y.; GUO, C.; LUO, Y.; LV, J. *et al.* Occurrence and distribution of antibiotics, antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing, China. *Environmental pollution*, v. 213, p. 833-840, 2016.

YOON, Y.; RYU, J.; OH, J.; CHOI, B.-G. *et al.* Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 3, p. 636-643, 2010.

ZENKER, A.; CICERO, M. R.; PRESTINACI, F.; BOTTONI, P. *et al.* Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, v. 133, p. 378-387, 2014.

ZHENG, S.; QIU, X.; CHEN, B.; YU, X. *et al.* Antibiotics pollution in Jiulong River estuary: source, distribution and bacterial resistance. *Chemosphere*, v. 84, n. 11, p. 1677-1685, 2011.

ZHOU, L.-J.; YING, G.-G.; LIU, S.; ZHAO, J.-L. *et al.* Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1244, p. 123-138, 2012.

ZHU, S.; HUO, S.; FENG, P. Developing Designer Microalgal Consortia: A Suitable Approach to Sustainable Wastewater Treatment. *In: Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*: Springer, 2019. p. 569-598.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; MELIS, M. *et al.* Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 179, n. 1, p. 1042-1048, 2010.

APÊNDICE A – Curvas de Calibração para os Antibióticos TMP, CEF e ERI

Figura A1 - Curvas analíticas do (a) SMX e (b) TMP para a batelada experimental realizada com a mistura destes antibióticos, obtida pelo método da dupla injeção.

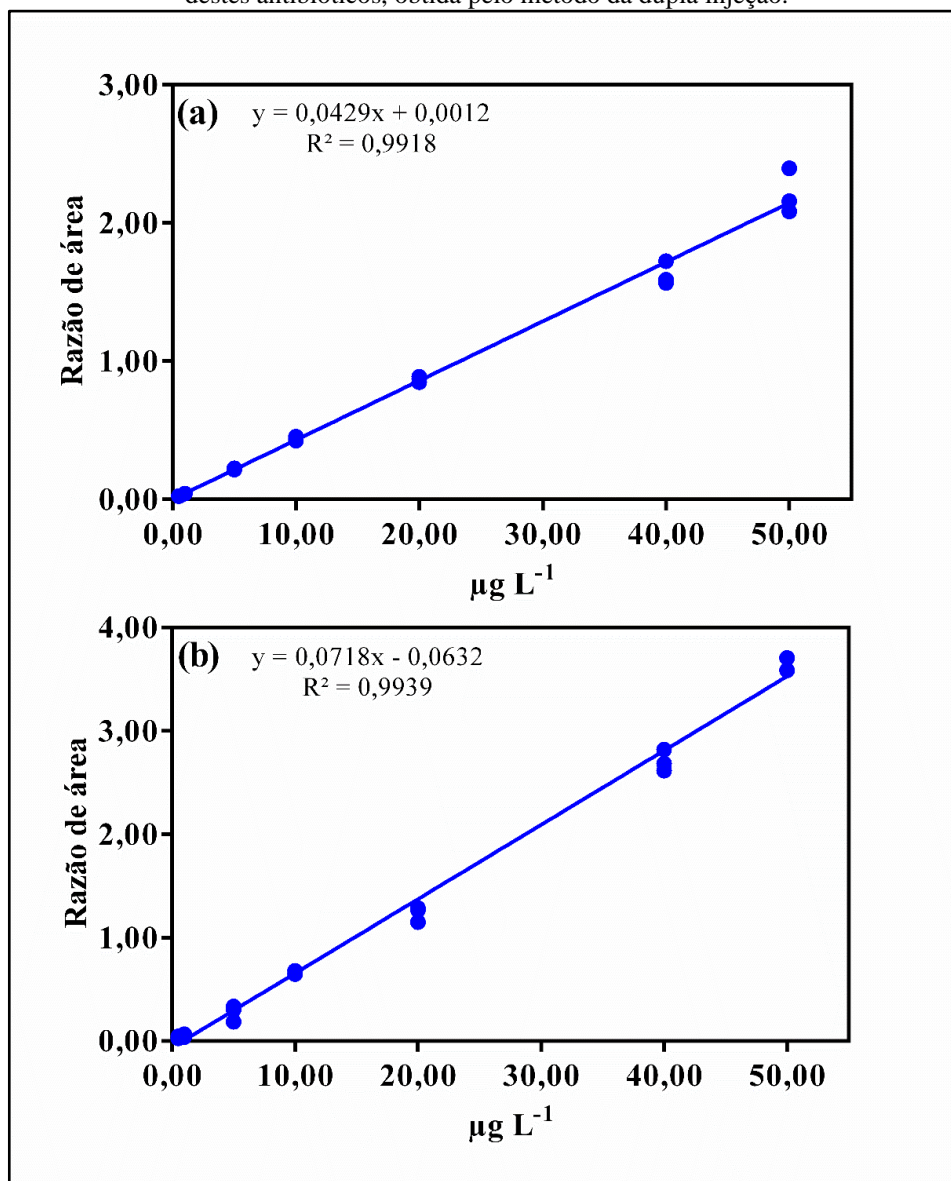


Figura A2 - Curva analítica da CEF obtida pelo método da dupla injeção.

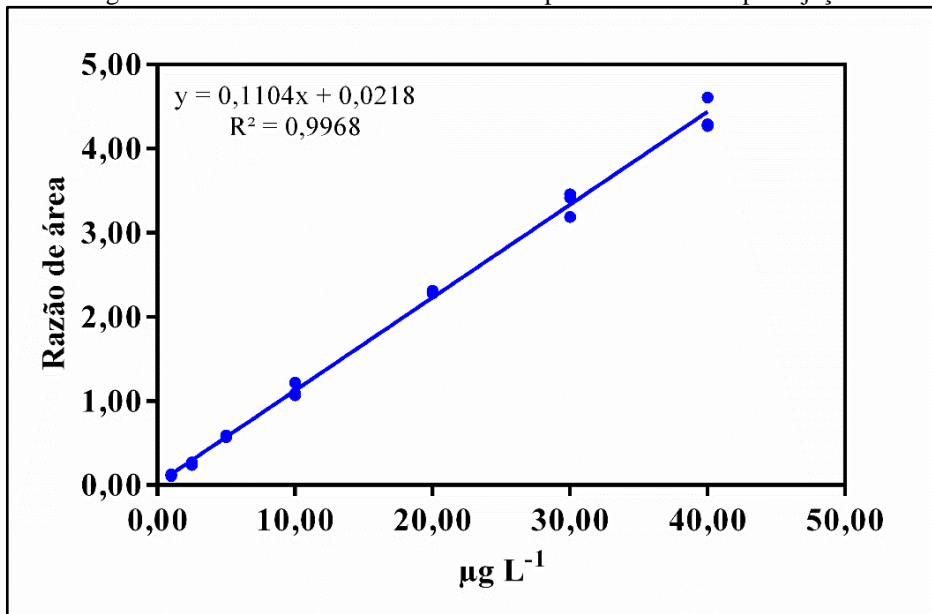


Figura A3 - Curva analítica da ERI obtida pelo método da dupla injeção.

