



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

ELOIZA PINHEIRO DAMASCENO

DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS POR *Aspergillus niger* AN400

FORTALEZA – CEARÁ

2012



ELOIZA PINHEIRO DAMASCENO

DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS POR *Aspergillus niger* AN400

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Glória Maria Marinho Silva
Coorientadora: Prof. Dra. Kelly de Araujo Rodrigues Pessoa

FORTALEZA – CEARÁ

2012

ELOIZA PINHEIRO DAMASCENO

DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS POR *Aspergillus niger* AN400

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Glória Maria Marinho Silva (Orientadora)
Instituto Federal do Ceará - IFCE

Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo
Instituto Federal do Ceará - IFCE

Prof. Dra. Marisete Dantas Aquino
Universidade Federal do Ceará - UFC

*“A verdadeira viagem de conhecimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”*

Marcel Proust.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora Dra. Glória Marinho, primeiramente pela compreensão, e também pela confiança e incentivos, pelo carinho de sempre, pelos ensinamentos que levarei para toda a vida.

A minha coorientadora Professora Dra. Kelly Rodrigues, que muito contribuiu para a realização deste trabalho, por quem tenho grande estima e admiração.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental (PGTGA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Professor Dr. Rinaldo Araújo, pela preciosa colaboração na realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento da bolsa de estudos.

A todos os demais professores do PGTGA, pelos preciosos conhecimentos compartilhados, que foram de grande importância para a abertura de caminhos até então inimagináveis.

Aos meus colegas de turma do PGTGA, pela amizade e incentivos, em especial a Jaqueline, com quem compartilhei muitos momentos difíceis da dolorosa vida de um mestrando.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM), pelo companheirismo e valorosa ajuda com os experimentos, pelo compartilhamento de momentos de dores e delícias, em especial à querida Raquel, à Doce Isabel, ao amado Marquinhos e ao sempre gentil Joab.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, apoio e valedouras correções.

A minha amiga Zuleika, a responsável pela introdução de efluentes, fungos e reatores na minha vida, pelos memoráveis momentos de muitas alegrias e infindáveis risadas e por sempre me fazer acreditar que no final dá tudo certo, mesmo quando tudo indica o contrário.

A minha família, sem a qual não encontraria sentido no existir, pelo suporte diário e apoio incondicional, pela paciência, atenção e carinho, por ser a razão da minha vontade de seguir vivendo e lutando por dias melhores.



RESUMO

Os compostos farmacêuticos, devido à sua utilização crescente e descontrolada, se tornaram uma preocupação ambiental. O efluente de indústria farmacêutica possui composição bastante variável, devido à grande diversidade de substâncias químicas produzidas nesta atividade, o que torna a remoção efetiva das substâncias contidas neste efluente uma tarefa difícil. Como alternativa de tratamento de efluentes farmacêuticos esta pesquisa estudou a influência da concentração inicial de fármacos e da concentração de glicose (0,5, 1,0 e 3,0 g/L), como cossubstrato, no desempenho de reatores inoculados com *Aspergillus niger* AN400 quanto à remoção de matéria orgânica, medida em termos de DQO. Os reatores foram alimentados com água residuária sintética rica em fármacos, produzida a partir de uma solução estoque, cuja composição continha: Benzilpenicilina benzatina (3.000.000 U.I./L), Benzilpenicilina procaína (1.500.000 U.I./L), Benzilpenicilina potássica (1.500.000 U.I./L), Estreptomicina (2.500 mg/L) e Piroxicam (180 mg/L). O experimento foi dividido em três etapas. Na Etapa I foram utilizados nove reatores em batelada com volume reacional de 2 L, biomassa dispersa e aeração artificial. Nesta etapa, a água residuária foi composta por solução de 5% da solução estoque. A remoção de matéria orgânica foi estudada em quatro tempos reacionais: 0, 2, 4 e 7 dias. As melhores eficiências de remoção de matéria orgânica aconteceram na presença da glicose, mas na menor concentração empregada (0,5 g/L), correspondente a 48%. Na Etapa II foram operados dois lotes de reatores, cada um com uma concentração diferente dos fármacos (5% e 2% da solução estoque), sob agitação. O melhor desempenho quanto à remoção de matéria orgânica (82%) ocorreu nos reatores que foram alimentados com solução de 2% da solução estoque e 0,5 g/L de glicose. Na Etapa III foi utilizado um único reator, operado em regime de bateladas sequenciais, com volume reacional de 4 L, e biomassa imobilizada. O reator foi operado por 6 ciclos de 7 dias cada. Esta configuração de reator resultou nos melhores percentuais de remoção das três etapas da pesquisa, correspondente a uma remoção média de matéria orgânica de 82%.

Palavras-Chaves: Reatores em batelada, fármacos, *Aspergillus niger*, cossubstrato.

ABSTRACT

The pharmaceutical compounds, due to their increasing use and uncontrolled, have become an environmental concern. The pharmaceutical effluent composition has quite variable, due to the large diversity of chemicals produced, which makes the effective removal of the substances contained in this effluent a difficult task. As an alternative of pharmaceutical wastewater treatment this research studied the influence of initial concentration of drugs and the concentration of glucose (0.5, 1.0 e 3.0 g/L), as co-substrate in the performance of the reactors inoculated with *Aspergillus niger* AN400 in the removal of organic matter, measured in terms of COD. The reactors were fed with wastewater rich in synthetic drugs, produced from a stock solution whose composition was: Benzathine penicillin (3,000,000 IU/L), Benzylpenicillin procaine (1,500,000 IU/L), Benzylpenicillin potassium (1,500,000 IU/L), Streptomycin (2,500 mg/L) and Piroxican (180 mg/L). The experiment was divided into three steps. Stage I were carried out with nine batch reactors of 2 L reaction volume, biomass and dispersed artificial aeration. At this stage, the wastewater was composed of 5% solution of stock solution. The removal of organic matter was studied in four reaction times: 0, 2, 4 and 7 days. The best removal efficiencies of organic matter occurred in the presence of glucose, at the lowest concentration used (0.5 g/L), which was 48%. In Step II were operated on two lots of reactors, each with a different concentration of drugs (5% and 2% of the stock solution) by stirring. The best performance for the removal of organic matter (82%) occurred in the reactors that were fed a 2% solution of stock solution and 0.5 g/L glucose. Step III was used in a single reactor, operated under the sequencing batch mode with 4 L reaction volume with immobilized biomass. The reactor was operated by six cycles of 7 days each. This configuration of the reactor resulted in better removal percentages of the three stages of research, whose average removal of organic matter of the 75%.

Key Words: Batch reactors, pharmaceutical compounds, *Aspergillus niger*, co-substrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2 - Culturas de <i>Aspergillus niger</i> AN400.	26
Figura 3 - Reatores em batelada com biomassa dispersa sob aeração a 27 °C.	30
Figura 4 - Reatores em batelada dispostos sobre mesa agitadora a 27 °C.	32
Figura 5 - Reator em batelada seqüencial com biomassa imobilizada sob aeração a 27 °C.	34
Figura 6 - Placas controle com glicose como única fonte de carbono.	34
Figura 7 - Placas com água residuária sintética na concentração de 5% da solução estoque.	43
Figura 8 - Placas com água residuária sintética na concentração de 25% da solução estoque.	35
Figura 9 - Placas com água residuária sintética na concentração de 50% da solução estoque.	35
Figura 10 - Placas com água residuária sintética na concentração de 100% da solução estoque.	36
Figura 11 - Reator com concentração de glicose de 3 g/L aos 2 dias de reação mostrando o crescimento da biomassa fúngica.	37
Figura 12 - Reator com concentração de glicose de 3 g/L aos 7 dias de reação com formação de biofilme aderido.	38
Figura 13 - Reatores com concentração de glicose de 0,5 g/L no quarto dia de reação apresentando crescimento de biomassa fúngica na forma de pellets de grande dimensão.	39
Figura 14 - Concentração de DQO nos reatores em batelada sob aeração para os tempos de reação estudados para uma concentração inicial de 5% da solução estoque.	42
Figura 15 - Variação de pH nos reatores em batelada com biomassa dispersa sob aeração em cada tempo de reação estudado.	44
Figura 16 - Eficiência de remoção de matéria orgânica, medida em DQO, em percentual, pelos reatores em batelada sob agitação em todos os tempos de reação estudados nesta pesquisa.	45
Figura 17 - Concentração de DQO, em cada tempo de reação estudados, nos reatores em batelada sob agitação com concentração inicial de 5% da solução estoque de fármacos.	46

Figura 18 - Concentração de DQO, em cada tempo de reação estudados, nos reatores em batelada sob agitação com concentração inicial de 2% da solução estoque de fármacos.	47
Figura 19 - Crescimento microbiano no reator controle com efluente contendo 2% da solução estoque.	48
Figura 20 - Reator de controle com efluente contendo 5% da solução estoque.	48
Figura 21 - Reator com efluente contendo 5% da solução estoque e ausência de glicose.	49
Figura 22 - Reator com efluente contendo 2% da solução estoque e ausência de glicose.	49
Figura 23 - Reator com efluente contendo 5% da solução estoque e 0,5 g/L de glicose.	50
Figura 24 - Reator com efluente contendo 5% da solução estoque e 1,0 g/L de glicose.	50
Figura 25 - Reator com efluente contendo 5% da solução estoque e 3,0 g/L de glicose.	51
Figura 26 - Reator com efluente contendo 2% da solução estoque e 0,5 g/L de glicose.	51
Figura 27 - Reator com efluente contendo 2% da solução estoque e 1,0 g/L de glicose.	52
Figura 28 - Reator com efluente contendo 2% da solução estoque e 3,0 g/L de glicose.	52
Figura 29 - Variação de pH nos reatores com efluente contendo 5% da solução estoque de fármacos.	53
Figura 30 - Variação de pH nos reatores com efluente contendo 2% da solução estoque de fármacos.	54
Figura 31 - Reator em batelada sequencial no momento da partida do ciclo três	55
Figura 32 - Reator em batelada sequencial no final do ciclo três.	55
Figura 33 - Variação da concentração de DQO nos cinco tempos de reação de cada um dos seis ciclos estudados.	56
Figura 34 - Percentual de remoção de matéria orgânica, medida em termos de DQO, nos cinco tempos de reação de cada um dos seis ciclos estudados.	56
Figura 35 - Variações de pH no reator em batelada sequencial ao longo dos seis ciclos estudados.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de Vishniac.	26
Tabela 2 - Composição da associação antibiótica mais anti-inflamatório não hormonal.	27
Tabela 3 - Composição da associação antibiótica de fármacos usados no experimento.	28
Tabela 4 - Concentrações resultantes de cada composto farmacêutico nos meios com 5% e 2% da solução estoque.	28
Tabela 5 – Metodologia empregadas na caracterização físico-química do meio aquoso sintético.	29
Tabela 6 - Caracterização físico-química do meio aquoso sintético.	36
Tabela 7 - Resultados da análise de DQO do meio mineral sintético mais a glicose, sem a presença dos fármacos.	37
Tabela 9 - Resultados da análise de SSV.	39
Tabela 9 - Remoção de DQO em percentual.	41
Tabela 10 - Biomassa formada nos reatores medida em SSV.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DQO	Demanda Química de Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Ocorrência e Efeito da Presença de Fármacos no Ambiente	19
3.2 Efeitos Ecotoxicológicos dos Fármacos	20
3.3 Antibióticos no Meio Ambiente	21
3.4 Remoção de Fármacos de Águas Residuárias	22
3.5 Fungos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Cultivo, Produção e Contagem dos Esporos de <i>Aspergillus niger</i> AN400	25
4.2 Água Residuária Sintética Contendo Fármacos	27
4.3 Teste Prévio de Inibição de <i>Aspergillus niger</i> AN400 pela Água Residuária Sintética	28
4.4 Caracterização Físico-Química do Meio	29
4.5 ETAPA I: Montagem e Operação dos Reatores em Batelada com Biomassa Dispersa sob Aeração	30
4.6 ETAPA II: Montagem e Operação dos Reatores em Batelada com Biomassa Dispersa sob Agitação	31
4.7. ETAPAI: Reator em Batelada Sequencial com Biomassa Imobilizada	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1 Teste Prévio de Inibição de <i>Aspergillus niger</i> N400 pela Água Residuária Sintética	34
5.2. Caracterização da Água Residuária Sintética	36
5.3. ETAPA I	37
5.4. ETAPA II	44
5.5. ETAPA III	54

6 CONCLUSÕES	59
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	73
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O interesse por produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais e sua capacidade de exercer toxicidade ao meio ambiente e a necessidade de avaliar seu risco ambiental aumentou desde o início dos anos noventa (MIÈGE *et al.* 2009).

Uma importante rota de entrada de produtos farmacêuticos no meio aquático é a descarga de resíduos industriais controlados. Uma vez que os tratamentos convencionais parecem não ser eficientes na degradação de fármacos, a remoção destes dos efluentes das companhias farmacêuticas deve ser considerado uma prioridade. Desta forma, a dispersão destes poluentes no ambiente seria consideravelmente atenuada (GONZÁLEZ *et al.* 2009).

Estima-se que aproximadamente metade das águas residuais de indústrias farmacêuticas produzidas em todo o mundo são descartadas sem passar por um tratamento específico (ENICK e MOORE, 2007).

A remoção efetiva de substâncias contidas em efluente de indústria farmacêutica é uma tarefa difícil devido à grande variedade de substâncias químicas produzidas, o que conduz a águas residuais de composição variável (MELERO *et al.* 2009).

Águas residuais da indústria farmacêutica têm sido tratadas tradicionalmente com o uso de processos físico-químicos (KULIK *et al.* 2008) e biológicos (SUMAN RAJ e ANJANEYULU, 2005). A maioria dos estudos de biodegradação de fármacos emprega lodos ativados como forma de tratamento (OPPENHEIMER *et al.* 2007; STACKELBERG *et al.* 2004).

Fungos e bactérias são os principais agentes decompositores biológicos presentes na natureza, contudo os fungos apresentam como vantagem a capacidade de produção de inúmeras enzimas como *lacase*, *proteases*, *ligninases*, *lipases*, *celulases*, *peroxidases* entre outras, as quais podem atuar sobre determinado poluente, tornando-o mais acessível à biodegradação (SAMPAIO *et al.* 2004).

O tratamento de águas residuais com fungos vem crescendo como tecnologia para o tratamento biológico de compostos persistentes. Os fungos já estão sendo utilizados com sucesso para remediação de solos contaminados com petróleo e seus derivados provenientes de vazamentos; para o tratamento de águas residuais de indústria de azeite de oliva, de indústria têxtil, de beneficiamento de castanha de caju, de refinaria de petróleo; águas sintéticas contaminadas com pesticidas e com fenol; entre outras (SILVA FILHO *et al.* 2006; ANDRADE *et al.* 2007; SANTAELLA *et al.* 2009; KAMEI *et al.* 2011; SANTOS *et al.* 2006; RODRIGUES, 2006).

Tendo em vista a capacidade dos fungos em degradar compostos recalcitrantes, esta pesquisa objetiva o emprego de *Aspergillus niger* AN400 no tratamento de água residuária sintética farmacêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o emprego reatores em batelada em três configurações diferentes, todos inoculados com *Aspergillus niger* AN400, para o tratamento de água residuária sintética rica em benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e piroxican.

2.2 Específicos

Verificar se há inibição do crescimento de *Aspergillus niger* na presença dos compostos farmacêuticos Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica, Estreptomicina e Piroxican nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 5% da solução estoque.

Analisar a eficiência de remoção de matéria orgânica em reatores em batelada sob aeração artificial, na ausência e na presença de glicose (0,5, 1,0 e 3,0 g/L) como cossustrato, de água residuária sintética contendo benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e piroxican, nas concentrações de 150.000 U.I./L, 75.000 U.I./L, 75.000 U.I./L, 125 mg/L e 9 mg/L, respectivamente.

Analisar a eficiência de remoção de matéria orgânica em reatores em batelada sob agitação, na ausência e na presença de glicose (0,5, 1,0 e 3,0 g/L) como cossustrato, de água residuária sintética contendo benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina, procaína, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e piroxican nas concentrações de 150.000 U.I./L, 75.000 U.I./L, 75.000 U.I./L, 125 mg/L e 9 mg/L, respectivamente.

Analisar a eficiência de remoção de matéria orgânica em reatores em batelada sob agitação, na ausência e na presença de glicose (0,5, 1,0 e 3,0 g/L) como cossustrato, de água residuária sintética contendo benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina, procaína, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e piroxican nas concentrações de 60.000 U.I./L, 30.000 U.I./L, 30.000 U.I./L, 50 mg/L e 3,6 mg/L, respectivamente.

Analisar a eficiência de remoção de matéria orgânica em reator em bateladas sequenciais, na presença de glicose (1,0 g/L) como cossustrato, de água residuária sintética contendo benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina, procaína, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e piroxican nas concentrações de 60.000 U.I./L, 30.000 U.I./L, 30.000 U.I./L, 50 mg/L e 3,6 mg/L, respectivamente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ocorrência e efeito da presença de fármacos no ambiente

Dentre o grande número de diferentes compostos orgânicos que podem entrar no meio ambiente, compostos farmacêuticos, devido à sua utilização crescente e descontrolada, recentemente se tornaram uma nova preocupação ambiental (DIETRICH *et al.* 2002)

Os fármacos incluem uma vasta gama de compostos químicos, com estruturas, funções, comportamentos e atividades muito diferentes. Somente na Europa, mais de 3000 ingredientes ativos foram aprovados apenas para cuidados médicos humanos (ZWIENER, 2007).

Segundo Kümmerer (2009), a produção de fármacos envolve uma série de etapas, muitas vezes envolvendo várias empresas em diferentes locais de produção, em que cada estágio do processo de produção, como acontece com a maioria dos tipos de produção química, envolve o risco de que resíduos químicos cheguem ao meio ambiente, a menos que sejam tomadas as medidas necessárias.

A presença de resíduos de fármacos no ambiente foi relatada pela primeira vez no final da década de 1970 (JONES *et al.* 2005).

Desde então, muitos estudos têm sido realizados sobre a sua ocorrência em compartimentos ambientais terrestres e aquáticos, ao passo que os possíveis efeitos adversos que os fármacos podem exercer nos ecossistemas ainda são desconhecidos (KOLPIN *et al.* 2002).

As principais fontes de contaminação ambiental por fármacos são provenientes da disposição contínua de efluentes liberados a partir de indústrias farmacêuticas, e produtos de excreção de tratamento médico de seres humanos e animais. Portanto, cada vez mais, este tem sido reconhecido como um problema ambiental emergente (KLAVARIOTI *et al.* 2009).

A ocorrência de micropoluentes orgânicos farmacologicamente ativos nas estações de tratamento de águas residuárias, que incluem os produtos farmacêuticos, os produtos de higiene pessoal e os produtos químicos de desregulação endócrina, tem tido muita atenção nos últimos anos (LIENERT *et al.* 2007).

Devido ao seu nível de produção elevado e seu comportamento farmacocinético durante o uso terapêutico normal (por exemplo, meia-vida, excreção urinária e fecal, e metabolismo), a presença de produtos farmacêuticos e seus metabólitos detectados em águas residuárias e efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs) foi apontada como a principal fonte de descarga destes compostos no meio ambiente (DAUGHTON e TERNES, 1999).

Globalmente, as concentrações medidas nos efluentes de estações de tratamento de esgoto e em ambientes aquáticos variam de nanogramas por litro a microgramas por litro (HALLING-SORENSEN *et al.* 1998). Para se determinar compostos farmacêuticos e seus metabólitos no ambiente são necessárias técnicas analíticas muito sensíveis e seletivas. De acordo com Dbska *et al.* (2004), técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa, são as mais utilizadas, sendo a espectroscopia de massa o sistema de detecção mais empregado.

Outra técnica utilizada é a ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), um imunoensaio bastante sensível, que envolve uma enzima vinculada a um antígeno ou anticorpo como marcador, para a detecção de uma proteína específica (DENG *et al.* 2003).

3.2 Efeitos ecotoxicológicos dos fármacos

Embora a toxicidade a seres humanos associada aos fármacos e seus metabólitos sejam conhecidos, o conhecimento da toxicidade ecológica desses compostos, quando presentes no ambiente, são escassas. Além disso, o comportamento de produtos farmacêuticos no ambiente poderiam ser significativamente diferentes daqueles observados em estudos animais e humanos devido às diferentes condições existentes no ambiente (KÜMMERER *et al.* 2000).

Compostos farmacêuticos são deliberadamente desenvolvidos para afetar as funções bioquímicas e fisiológicas dos sistemas biológicos em seres humanos e animais. No entanto, eles também podem provocar alterações bioquímicas e fisiológicas em outros organismos aquáticos e terrestres (ERICKSON, 2002).

Os compostos farmacêuticos podem ser bioacumuláveis, afetando negativamente os organismos aquáticos através da alteração dos seus processos fisiológicos, funções reprodutivas, bem como contribuindo para o desenvolvimento da resistência de cepas de bactérias a antibióticos (BOYD e FURLONG, 2002).

Devido ao seu modo específico de ação e ao fato de que estes compostos são intencionalmente desenvolvidos para exercer um efeito sobre os seres humanos, mamíferos ou outros vertebrados, os resíduos de produtos farmacêuticos podem ser tão ou mais importantes para a saúde humana do que os pesticidas, que são criados para afetar as ervas daninhas, fungos e invertebrados (CLEUVERS, 2003).

Portanto, a probabilidade de haver risco ambiental decorrente destes compostos não pode ser descartada, como foi demonstrado para poluentes prioritários convencionais, em especial os agrotóxicos de maior toxicidade, que demonstram persistência no ambiente. Considerando apenas a literatura científica não confidencial, ainda há uma falta real de

informações para executar uma caracterização de risco ambiental, em particular sobre os dados de ecotoxicidade (FERRARI *et al.* 2003).

Segundo Crane *et al.* (2006), tem-se verificado que a contínua introdução de fármacos no meio hídrico, conduz mais facilmente a efeitos crônicos que a efeitos agudos. Um exemplo disso é a alteração de comportamento que reduz a adaptabilidade de um organismo.

Um problema que se levanta é a exposição às misturas de compostos farmacêuticos, que não representam risco por si só, mas que podem contribuir para aumentar a toxicidade de outros, através de sinergismo. Segundo Guerrero-Preston e Brandt-Rauf (2008), a mistura de compostos farmacêuticos detectada no meio hídrico, mesmo em baixas concentrações (ng/L), inibe o crescimento *in vitro* de células embrionárias de rim humano. Estes resultados sugerem que a mistura de resíduos farmacêuticos, mesmo a concentrações irrisórias, podem inibir a proliferação de células afetando a sua fisiologia e morfologia.

3.3 Antibióticos no meio ambiente

Os antibióticos constituem um grupo diversificado de produtos químicos que podem ser divididos em subgrupos tais como β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas e outros. Os compostos ativos de antibióticos são, muitas vezes, moléculas complexas, que podem possuir diferentes funcionalidades, fazendo com que suas propriedades físico-químicas e biológicas possam mudar com alterações de pH (KÜMMERER, 2009).

Uma grande quantidade de antibióticos são produzidos, consumidos e aplicados no tratamento de doenças bacterianas em seres humanos e promoção do crescimento animal (KÜMMERER, 2003).

Em muitos países, uma grande quantidade de antibióticos extremamente resistentes tem sido encontrados em esgotos tratados, efluentes industriais, no ambiente aquático e até mesmo na água potável (GUTIERREZ *et al.* 2002).

Os antibióticos são particularmente preocupantes, pois podem induzir a resistência bacteriana, mesmo em baixas concentrações (HERNÁNDEZ *et al.* 2007; PAUWELS e VERSTRAETE, 2006; SCHWARTZ *et al.* 2003). O uso abusivo de antibióticos e a existência de resíduos de antibióticos no ambiente têm sido relacionados com a formação de resistência aos antibióticos (BOXALL *et al.* 2003).

Alguns dados disponíveis a respeito de antibióticos indicam sua capacidade de exercer efeitos sobre organismos vivos mesmo em concentrações de ng/L e μ g/L (HALLING-SØRENSEN, 2000).

Efeitos tóxicos de antibióticos comuns sobre diferentes organismos (bactérias, algas, *Artemia salina*, *Daphnia magna*) foram encontrados mesmo em doses de exposição muito baixas (WOLLENBERGER *et al.* 2000; FERRARI *et al.* 2003).

De acordo com Arslan-Alaton e Caglayan (2006), os efluentes gerados a partir da formulação de antibióticos podem ser definidos como águas residuárias com pH neutro (6 – 8), carga média de DQO (200 – 2000 mg/L), baixa DBO (0 – 100 mg/L), e baixos sólidos suspensos voláteis (SSV; 100 – 400 mg/L). Portanto, estes efluentes podem ser considerados como pouco biodegradáveis.

3.4 Remoção de fármacos de águas residuárias

O desaparecimento de uma substância não indica necessariamente que ocorreu degradação biológica ou fotoquímica. Uma importante via de eliminação envolve a sorção dos produtos farmacêuticos. Isto depende do grau de espécies neutras e iônicas presentes e as características das moléculas alvo. A sorção pode ter um impacto sobre a propagação e a (bio)disponibilidade de fármacos no meio ambiente e, portanto, sobre a remoção destes compostos durante o tratamento de águas residuárias. Alguns antibióticos, como por exemplo, as tetraciclina, são conhecidos por terem uma tendência a ligar-se a partículas de solo ou de formar complexos com os íons presentes (ver LAAK *et al.* 2006).

Ainda segundo Kümmerer (2008), antibióticos pode se difundir em biofilmes presentes em canos de esgoto, flocos de lodo ou pedras de rios ou lagos. Isso pode resultar em estimativas de risco tendenciosas, pois a concentração em tais —reservatórios‖ pode ser maior que na fase de água livre. Os efeitos e o comportamento dos antibióticos em biossólidos com alta densidade de bactérias e condições especiais ainda não foram investigados. Não se sabe quão fortemente os antibióticos são sorvidos ao lodo e em que circunstâncias estes estão (bio)disponíveis e ativos após a sorção.

Ikehata *et al.* (2006) investigaram a remoção de compostos farmacêuticos das águas através de processos avançados de oxidação e da ozonização, e segundo os autores, os poluentes orgânicos persistentes, como é o caso dos compostos farmacêuticos, podem ser degradados através destes processos. Estes processos de tratamento podem eliminar completamente os fármacos ou convertê-los em produtos menos prejudiciais para a saúde humana e para o meio aquático.

Pelo fato da degradação parcial dos compostos orgânicos facilitar a sua biodegradabilidade, a ozonização e os processos avançados de oxidação podem ser usados

como pré-tratamento das águas residuais, antes do tratamento biológico. (IKEHATA *et al.* 2006).

A maioria dos estudos de biodegradação de fármacos baseia-se na remoção destes compostos por lodos ativados (OPPENHEIMER *et al.* 2007).

Lodos ativados constituem um consórcio de micro-organismos de crescimento rápido em um meio com alta concentração de fonte de carbono, que não é representante da população de bactérias e das condições observadas nos sistemas do ambiente natural. Culturas puras possibilitam que micro-organismos de metabolismo oligotrófico alcancem a biodegradação de xenobióticos, e oferecem um caminho para se estudar o destino ambiental dos produtos farmacêuticos (GAUTIER *et al.* 2010).

3.5 Fungos

O emprego de fungos no tratamento de efluentes começou a ser estudado nos últimos trinta anos do século XX (RODRIGUES, 2006), tendo ocorrido, nas duas últimas décadas, um incremento nas pesquisas de biodegradação por fungos (PESSOA-WANDERLEY, 2007).

Os fungos têm sido usados em várias pesquisas de biodegradação, envolvendo processos diversos e com uma grande variedade de substratos, tais como: na remoção de cor em reator de leito fixo e fluxo ascendente, com dois tipos de meio suporte e TDH de 20 dias (SANTAELLA, 1993); no tratamento do efluente da indústria de laticínios com operação em batelada e em fluxo (SÁ, 1997); no tratamento do efluente da indústria de azeite de oliva com operação em batelada, como pré-tratamento de sistema anaeróbio (GHARSALLAH *et al.* 1999); na remoção de metil paration – inseticida e atrazina – herbicida presentes em água com operação em batelada, na presença e ausência de glicose (SAMPAIO, 2004); na remoção de fenol em reatores contínuos e escoamento ascendente, com dois tipos de meio suporte e TDH de 4 h e 6 h (RODRIGUES, 2006); na utilização de reator aeróbio com fungos para remoção de nutrientes e matéria orgânica de efluente de filtro anaeróbio tratando meio sintético com corante vermelho congo (BARBOSA *et al.* 2007); na remoção de corante têxtil em reator biológico com fungos (ANTUNES *et al.* 2006); na degradação de fenol por *Aspergillus niger* AN400 em reatores em batelada (PINHEIRO *et al.* 2010).

Entretanto, para que esta tecnologia seja aplicada em larga escala de forma viável, se faz necessário que todas as variáveis referentes ao processo de micorremediação sejam estudadas, a fim de garantir a eficiência do tratamento com fungos com grandes volumes de efluentes. Quanto à configuração dos reatores, deve-se estudar quais os melhores tempos de reação, para reatores em batelada, e quais os melhores tempos de detenção hidráulica, para os

reatores de escoamento contínuo. Também pode ser estudada a influência do tipo e da concentração de cossubstrato sobre a velocidade da degradação do poluente, a eficiência global do processo e o nível de mineralização do poluente. Além disso, com o advento da biotecnologia, pode-se lançar mão do uso de espécies geneticamente modificadas, objetivando a maior eficiência do processo, entre outros aspectos (RODRIGUES *et al.* 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em três etapas com reatores em batelada inoculados com *Aspergillus niger* AN400. Foi estudada experimentalmente a eficiência de degradação de água residuária sintética contendo fármacos pelo uso da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN400.

A Figura 1 apresenta um esquema com o desenvolvimento das etapas da pesquisa.

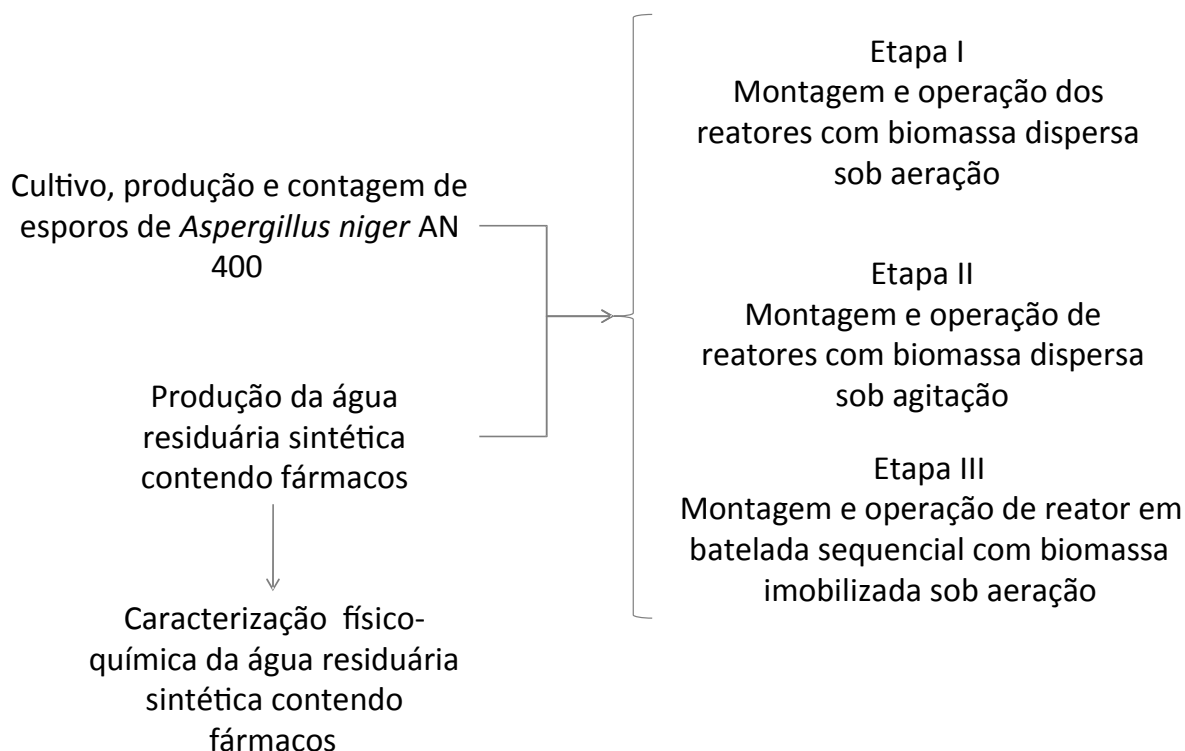


Figura 1 – Fluxograma das etapas de desenvolvimento da pesquisa.

4.1 Cultivo, produção e contagem dos esporos de *Aspergillus niger* AN 400

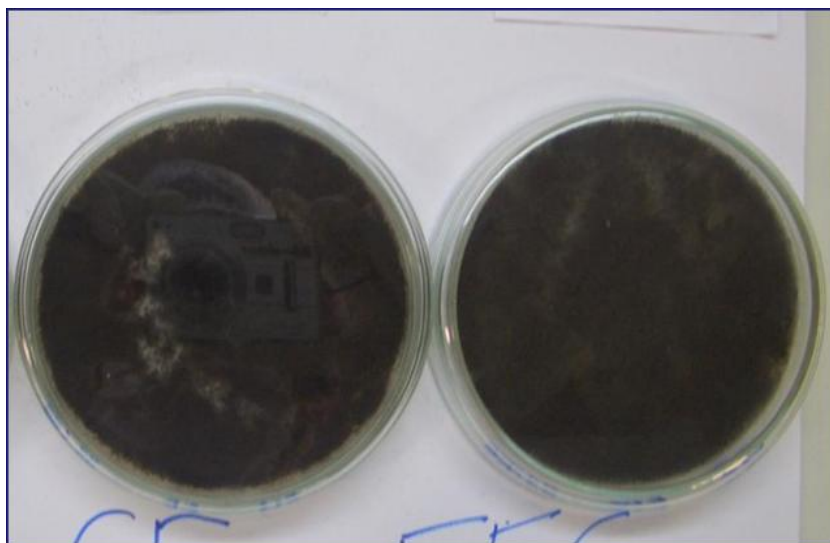
Os esporos de *Aspergillus niger* AN400 foram cultivados no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), tendo-se utilizado placas de Petri estéreis, que continham 15 mL de meio de cultura *Sabouraud*, meio específico para o crescimento dos fungos – mistura de peptonas, ágar-ágar, 2% de dextrose e glicose – o qual foi previamente esterilizado a 121°C, durante 15 minutos.

Adicionou-se ainda às placas, solução de Vishniac, cuja composição está descrita na Tabela 1, na concentração de 1 mL/L de meio de cultura, como fonte de nutrientes para os fungos.

Tabela 1 – Composição da solução de Vishniac.

Composição	Concentração (g/L)
EDTA	10
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,22
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,47
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1

Após a solidificação do meio de cultura, os esporos foram inoculados nas placas e estas foram mantidas sob temperatura de 28 °C por 7 dias, período após o qual foi verificado o crescimento dos fungos, com o preenchimento de toda a superfície das placas (Figura 2), tendo-se então, procedido a remoção dos esporos.

**Figura 2 – Culturas de *Aspergillus niger* AN400.**

Os esporos foram removidos com o auxílio de alça de Drigalsky estéril e solução de Tween 80, formando uma suspensão, que foi retirada da superfície de cada placa com uso de pipeta automática, previamente esterilizada, sendo em seguida transferida para frascos esterilizados de 200 mL, onde ficou armazenada sob refrigeração de -10 °C, até o momento da semeadura no reator, quando foi descongelada e agitada para melhor homogeneização.

Para a contagem dos esporos foi preparada uma suspensão de esporos utilizando 50 μL da suspensão original, previamente agitada em agitador Vórtex, acrescido de 950 μL de solução Tween 80, resultando em solução de 1:20. Em seguida, 20 μL da solução preparada foram transferidos para câmara de Neubauer, onde se processou a contagem dos esporos em microscópio óptico Bioval com aumento de 400 vezes.

4.2 Água residuária sintética contendo fármacos

Os compostos farmacêuticos utilizados foram os antibióticos benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e o anti-inflamatório não hormonal piroxican, provenientes de uma associação injetável de uso veterinário, comercialmente denominado Megacilin Super Plus e fabricado pela Agener União Química, cuja formulação está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição da associação antibiótica de fármacos usados no experimento.

Componentes	Conteúdo
Benzilpenicilina benzatina	3.000.000 U.I.
Benzilpenicilina procaína	1.500.000 U.I.
Benzilpenicilina potássica	1.500.000 U.I.
Estreptomicina	2.500 mg
Piroxican	180 mg
Veículo q.s.p.	15 mL

Uma solução estoque foi preparada dissolvendo o conteúdo de uma unidade de Megacilin Super Plus (15 mL) em 1 litro de água destilada. A solução foi esterilizada a 121°C, durante 15 minutos.

A água residuária sintética utilizada nas três etapas desta pesquisa foi preparada com água da torneira misturada a um meio mineral básico, de acordo com Rodrigues (2006), cuja composição e as concentrações de cada componente encontram-se apresentadas na Tabela 3, e os fármacos que, em um primeiro momento da pesquisa foram adicionados na concentração de 5% da solução estoque, e num segundo momento, 2% da referida solução. As concentrações resultantes de cada composto farmacêutico nos meios com 5% e 2% da solução estoque são apresentadas na Tabela 4. Nas etapas I e II da pesquisa, a glicose foi adicionada como cossustrato em três concentrações diferentes (g/L): 0,5; 1,0 e 3,0. Nestas etapas,

também foi estudado o decaimento da matéria orgânica sem a presença do cossubstrato. Na etapa III, a glicose foi adicionada somente na concentração de 0,5 g/L.

Tabela 3 – Composição do meio mineral sintético.

Componentes	Concentração (g/L)
NH ₄ SO ₄	2
NaNO ₃	1
KH ₂ PO ₄	0,20
MgSO ₄	0,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,08
H ₂ MoO ₄	0,05
MnSO ₄ . 7H ₂ O	0,05
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,05
ZnSO ₄	0,04

Tabela 4 – Concentrações resultantes de cada composto farmacêutico nos meios com 5% e 2% da solução estoque.

Composto	Concentração em meio com 5% da solução estoque	Concentração em meio com 2% da solução estoque
Benzilpenicilina benzatina	150.000 U.I./L	60.000 U.I./L
Benzilpenicilina procaína	75.000 U.I./L	30.000 U.I./L
Benzilpenicilina potássica	75.000 U.I./L	30.000 U.I./L
Estreptomicina	125 mg/L	50 mg/L
Piroxican	9 mg/L	3,6 mg/L

4.3 Teste prévio de inibição de *Aspergillus niger* AN400 pela água residuária sintética

Os testes prévios de inibição microbiana foram realizados em duplicata, utilizando-se 20 placas de Petri que receberam substrato composto de meio mineral básico, descrito na Tabela 3, e os compostos farmacêuticos presentes na associação antibiótica mais anti-inflamatória não hormonal, descrita na Tabela 2. Também foi adicionado Ágar na

concentração de 18 g/L para proporcionar a solidificação do meio. O substrato foi preparado com diferentes concentrações da associação de compostos farmacêuticos (100%, 50%, 25% e 5%), obtidas pela diluição da solução estoque descrita no item 2.2 em água destilada. Duas placas foram preparadas com glicose como fonte única de carbono para servir como controle. Cada placa recebeu 20 mL do substrato e inóculo de *Aspergillus niger*, na forma de solução de esporos, na concentração de 8×10^8 esporos/mL. As placas foram mantidas a uma temperatura de 28°C, durante um período de sete dias. O crescimento dos fungos foi verificado apenas visualmente.

4.4 Caracterização físico-química do meio

Para a caracterização físico-química do meio foram realizadas análises de DQO, amônia, nitrito, nitrato, fósforo total, oxigênio dissolvido, pH e temperatura. Todos de acordo com APHA (2005). Na Tabela 5 são apresentadas as análises realizadas na caracterização da água residuária e os respectivos métodos analíticos empregados.

Tabela 5 – Metodologias empregadas na caracterização físico-química do meio aquoso sintético.

Parâmetros	Método
Temperatura (°C)	Sonda
pH	Potenciométrico
OD (mg O ₂ /L)	Sonda
DQO (mg O ₂ /L)	Método de Winkler
Amônia (mg NH ₃ /L)	Nesslerização direta
Nitrito (mg NO ₂ ⁻ /L)	Método da sulfanilamida
Nitrato (mg NO ₃ ⁻ /L)	Método N-(1-naftil)-etilenodiamina.
Fósforo Total (mg P/L)	Método do Ácido Ascórbico
SSV (mg/L)	Gravimétrico

A caracterização foi realizada com a água residuária produzida para alimentar os reatores da etapa I, conforme descrito no item 4.4. Portanto, os fármacos estavam presentes na concentração de 5% da solução estoque.

Também foi realizada análise de DQO do meio mineral sintético (Tabela 3) contendo glicose nas três concentrações utilizadas nas etapas I e II (0,5, 1,0 e 3,0 g/L), sem a presença

dos fármacos, para verificar qual a contribuição apenas da glicose na carga orgânica total da água residuária sintética.

4.5 ETAPA I: Montagem e operação dos reatores em batelada com biomassa dispersa sob aeração

Os reatores utilizados nesta etapa consistiam de frascos de vidro com volume total de 2,5 L e volume útil de 2 L, vedados com tampa plástica. O meio foi submetido a aeração constante por meio de mini-compressores de ar.

Foram montados nove reatores, sendo um para controle (sem inóculo fúngico e sem glicose), dois reatores para cada concentração de glicose estudada (0,5 g/L, 1,0 g/L e 3,0 g/L), totalizando seis reatores com glicose, e ainda dois reatores com ausência de glicose. A concentração adotada foi de 5%, tendo apenas os fármacos como fonte de carbono (Figura 3).



Figura 3 – Reatores em batelada com biomassa dispersa sob aeração a temperatura ambiente a 27 °C.

O decaimento da concentração de matéria orgânica no meio aquoso foi estudada em três tempos de reação nesta etapa: 2, 4 e 7 dias. A medida da matéria orgânica na água residuária foi feita em termos de DQO. Adicionalmente foram feitas análises de pH, amônia, nitrito, nitrato e fósforo total.

No final do experimento, a biomassa formada foi medida por peso seco. O líquido contido nos reatores foi drenado até que a biomassa ficasse embebida em 100 mL de líquido

em cada reator. Este conteúdo restante, então, foi transferido para cápsulas de porcelana, previamente pesadas (P1), e levados a banho-maria a 80°C até que toda a água evaporasse. Em seguida, as cápsulas passaram 30 minutos em estufa de secagem a 105°C, para que fosse removida toda a umidade. Depois de esfriar dentro de dessecador, as cápsulas foram novamente pesadas (P2), e a massa referente à biomassa foi dada pela diferença entre P2 e P1.

4.6 ETAPA II: Montagem e operação dos reatores em batelada com biomassa dispersa sob agitação

Nesta etapa foram montados dois lotes de reatores, cada um com uma concentração diferente dos fármacos. No primeiro lote, os reatores foram preenchidos com o mesmo meio utilizado na etapa I, ou seja, uma solução de 5% da solução estoque. No segundo lote, os reatores foram alimentados com uma solução a 2% da solução estoque.

Os reatores consistiam de frascos Erlenmeyer de 250 mL, preenchidos com 200 mL da água residuária, e mantidos sob agitação em mesa agitadora a 150 rpm a 27 °C.

Para cada lote foram montados nove reatores, sendo um para controle (sem inóculo fúngico e sem glicose), dois reatores para cada concentração de glicose estudada (0,5, 1,0 e 3,0 g/L), totalizando seis reatores com glicose, e ainda dois reatores sem glicose, tendo apenas os fármacos como fonte de carbono. A Figura 4 mostra os reatores em batelada dispostos na mesa agitadora.



Figura 4 – Reatores em batelada dispostos sobre mesa agitadora a 27 °C.

O decaimento da concentração de matéria orgânica no meio aquoso foi estudada em cinco tempos de reação: 1, 3, 6, 9 e 12 dias. A medida da matéria orgânica na água residuária foi feita em termos de DQO. Também foram feitas medidas de pH e determinação do peso seco da biomassa conforme descrito no subitem 4.4.

4.7 ETAPA III: Reator em batelada sequencial com biomassa imobilizada sob aeração

Nesta etapa foi utilizado um único reator, operado em regime de batelada seqüencial, o qual consistia de um frasco de vidro com volume total de 5 L, sendo usado no experimento o volume útil de 4 L, vedado com tampa plástica específica. Na tampa foram feitos dois orifícios por onde passavam mangueiras que traziam o ar proveniente dos mini-compressores de ar.

A biomassa foi imobilizada em cubos de poliuretano (1 cm de aresta), acondicionados em redes de polietileno dentro do próprio reator. Ao todo, foram utilizados 15 g de meio suporte divididos igualmente em três redes. Este processo de crescimento da biomassa imobilizada levou 7 dias. Para isto, o reator foi preenchido com 4 L do meio aquoso sintético descrito na Tabela 3, e glicose na concentração de 1,0 g/L.

Após o desenvolvimento do biofilme sobre o meio suporte, iniciou-se a alimentação do reator com a água residuária sintética. Nesta etapa optou-se por utilizar a água residuária com concentração de 2% da solução estoque.

O reator foi operado por 6 ciclos, os quais possuem individual duração de 7 dias. No início de cada ciclo, o meio aquoso do reator era renovado.

Ao longo de cada ciclo foram retiradas alíquotas nos tempos reacionais de 1, 2, 3, 4 e 7 dias. Foi estudada remoção de matéria orgânica, medida em termos de DQO e foram feitas medidas de pH em cada tempo reacional estudado.

Na Figura 5 está apresentado o reator utilizado nesta etapa de estudo.



Figura 5 – Reator em batelada seqüencial com biomassa imobilizada sob aeração a 27 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Testes de inibição do *Aspergillus niger* AN400 pela água residuária sintética

Após os sete dias destinados ao cultivo de *Aspergillus niger* AN400 nas placas de Petri contendo a água residuária farmacêutica sintética em quatro concentrações distintas (100, 50, 25 e 5%), e nas placas de controle, que não continham os fármacos, e sim glicose como fonte de carbono, foi observado o crescimento do fungo. Como pode ser visualizado nas Figuras 6, 7, 8, 9 e 10, o *Aspergillus niger* AN400 foi capaz de crescer em todas as placas, sendo observado inibição nas placas de maior concentração dos fármacos.

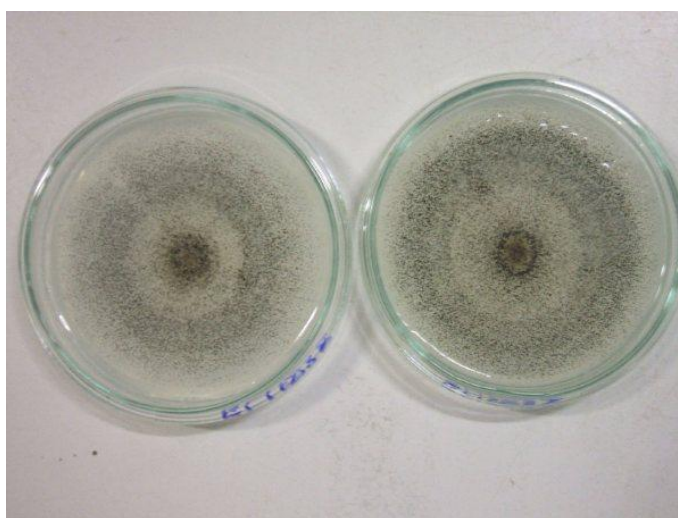


Figura 6 – Placas controle contendo glicose como fonte única de carbono.

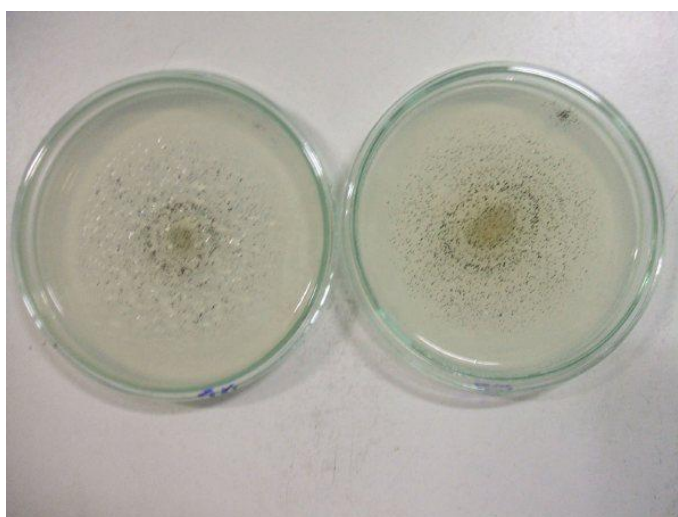


Figura 7 – Placas com água residuária sintética na concentração de 5% da solução estoque.

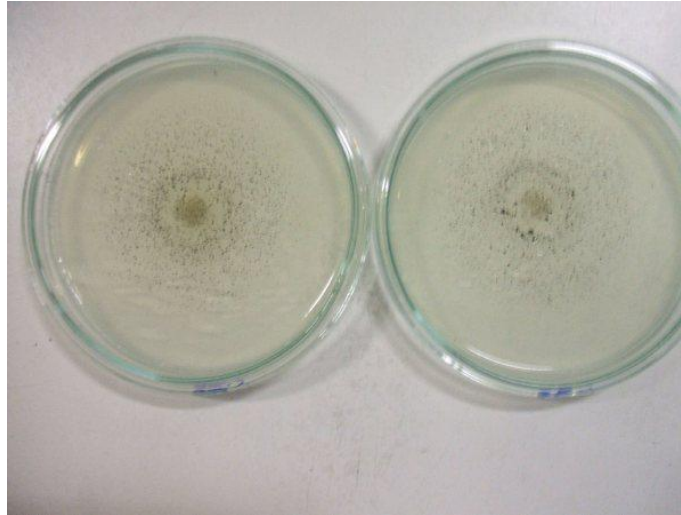


Figura 8 – Placas com água residuária sintética na concentração de 25% da solução estoque.

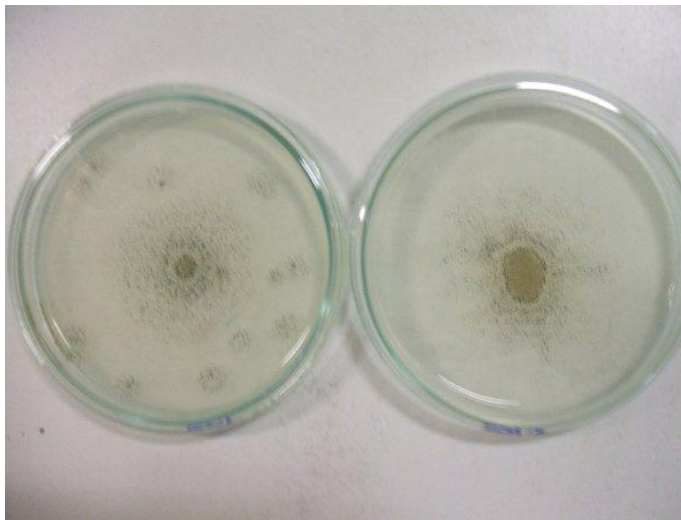


Figura 9 – Placas com água residuária sintética na concentração de 50% da solução estoque.

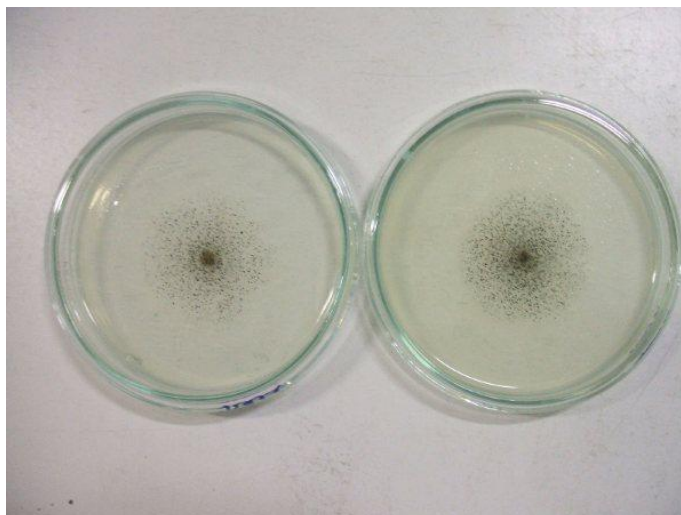


Figura 10 – Placas com água residuária sintética na concentração de 100% da solução estoque.

5.2 Caracterização da água residuária sintética

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados das análises realizadas para a caracterização físico-química da água residuária sintética rica em compostos farmacêuticos.

Tabela 6 – Caracterização físico-química do meio aquoso sintético.

Parâmetros	Valores detectados
Temperatura (°C)	29
pH	5,1
OD (mg O ₂ /L)	6,2
DQO (mg O ₂ /L)	610
Amônia (mg NH ₃ /L)	1193,7
Nitrito (mg NO ₃ ⁻ /L)	0,07
Nitrato (mg SO ₄ ²⁻ /L)	69,2
Fósforo Total (mg P/L)	27,3

Os resultados da análise de DQO do meio mineral sintético contendo a glicose, na ausência dos fármacos, para verificar qual a contribuição desse açúcar na carga orgânica total da água residuária sintética estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da análise de DQO do meio mineral sintético mais a glicose, sem a presença dos fármacos.

Concentração de glicose	DQO (mg/L)
0,5 g/L	308
1,0 g/L	356
3,0 g/L	488

5.3 ETAPA I

Durante a primeira etapa da pesquisa, nos reatores com 3,0 g/L de glicose, foi observado crescimento de biomassa fúngica em maior quantidade que nos demais reatores. A biomassa cresceu inicialmente aderida à parede do fundo dos reatores, como foi observado aos 2 dias de reação (Figura 11). No quarto dia de reação, observou-se aumento acentuado da quantidade desta biomassa que cresceu formando um biofilme aderida ao vidro, além da formação de alguns *pellets* que podem ser visualizados na Figura 12.

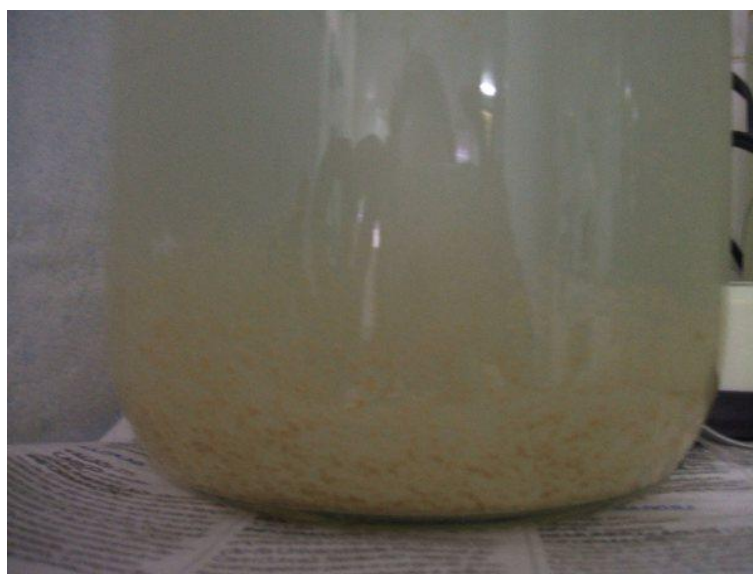


Figura 11 – Reator com concentração de glicose de 3 g/L aos 2 dias de reação mostrando o crescimento da biomassa fúngica.



Figura 12 – Reator com concentração de glicose de 3 g/L aos 7 dias de reação com formação de biofilme aderido.

Aos dois dias de reação, nos reatores que receberam adição de glicose, nas concentrações iniciais de 0,5 g/L e 1,0 g/L, foi observado crescimento de biomassa fúngica aderida à pedra difusora de ar e dispersa no líquido, respectivamente. No quarto dia de reação foi observado crescimento de biomassa fúngica na forma de *pellets*, que eram de grandes dimensões (cerca de 10 mm de diâmetro), nas duas concentrações do cossustrato, permanecendo assim até o sétimo dia de reação (Figura 13).

Nos reatores de controle e sem glicose não foi observado, visualmente, crescimento de biomassa no primeiro tempo de reação (2 dias). Entretanto, pôde-se verificar crescimento de biomassa fúngica após o segundo tempo de reação (4 dias), e um aumento da quantidade desta biomassa no terceiro tempo de reação (7 dias), nestes reatores.

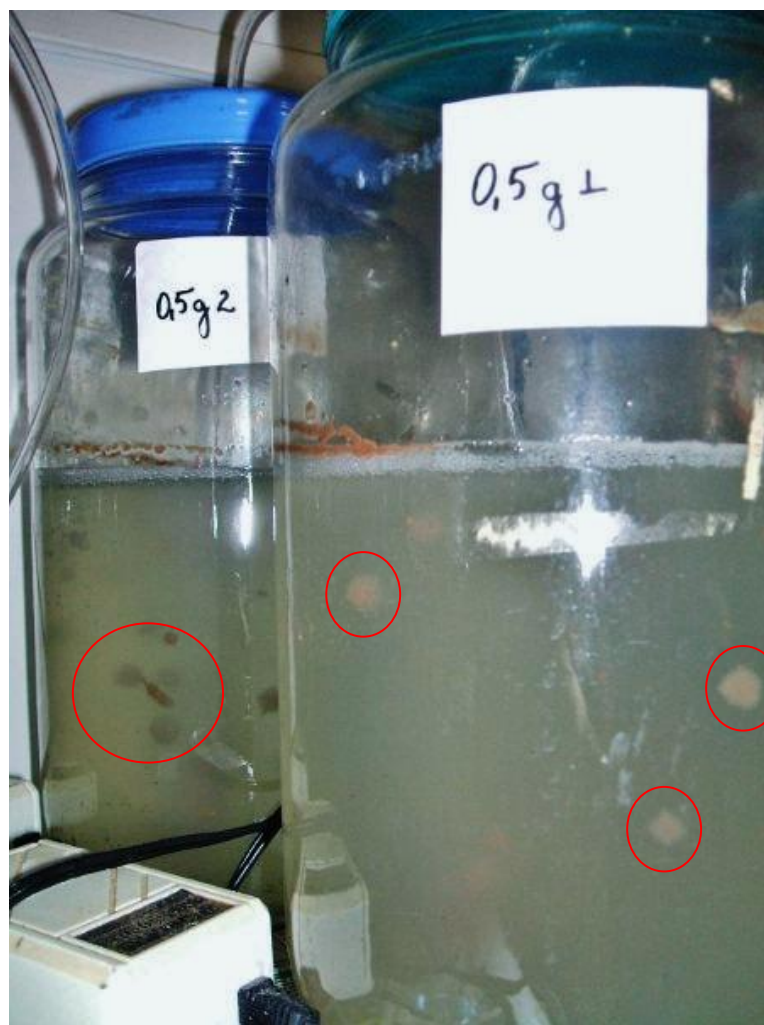


Figura 13 – Reatores com concentração de glicose de 0,5 g/L no quarto dia de reação apresentando crescimento de biomassa fúngica na forma de pellets de grande dimensão.

Os resultados da análise de SSV, feita para verificar o crescimento da biomassa em cada reator estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da análise de SSV.

Reatores	SSV (mg/L)
0,5 g/L de glicose	343
1 g/L de glicose	326
3 g/L de glicose	432
Ausência de glicose	245
Controle	241

A forma de crescimento da biomassa pode influenciar a eficiência do tratamento de reatores inoculados com fungos. Segundo Grimm *et al.* (2005), os fungos filamentosos como *A. niger* apresentam morfologias de crescimento diferentes em culturas submersas, variando de formas compactas (pellets) a formas filamentosas, que afetam fortemente o desempenho total das células.

A biomassa fúngica também pode apresentar crescimento aderido a um meio suporte, formando um biofilme. A estrutura típica do biofilme microbiano inclui uma complexa arquitetura tridimensional caracterizada por espaços intersticiais e canais, com células geralmente encapsuladas em uma matriz extracelular (STOODLEY *et al.* 2002).

A estrutura canalizada do biofilme apresenta a vantagem evidente de permitir a passagem de fluidos pelos canais (VILLENNA *et al.* 2010).

Os *pellets* de *Aspergillus* são caracterizados por uma rede de hifas emergindo radialmente a partir de um núcleo denso, sem controle aparente de densidade (VILLENNA e GUTIÉRREZ-CORREA, 2007).

Uma vantagem importante da morfologia peletizada é a diminuição da viscosidade de culturas fluidas, resultando em melhores mistura e transferência de massa. As principais desvantagens ao crescimento peletizado envolvem as limitações da transferência de massa no interior dos pellets, levando a significativos gradientes de concentração de oxigênio e outros nutrientes a partir do meio líquido para o interior do núcleo do pellet. Essas limitações podem finalmente resultar em processos autolíticos na parte interna dos grandes pellets fúngicos (HILLE *et al.* 2005 e RINAS *et al.* 2005).

Uma vez que, nesta etapa da pesquisa, os reatores com crescimento de biomassa na forma peletizada apresentaram maior eficiência de remoção de matéria orgânica (Tabela 9), possivelmente, a degradação de fármacos por fungos foi favorecida por um meio menos viscoso (contendo 0,5 e 1,0 g/L de glicose) em relação ao reator onde se formou biofilme (3,0 g/L).

Verificou-se que os melhores desempenhos ocorreram nos reatores com 0,5 e 1,0 g/L de glicose, em que chegou-se a 48% de remoção de DQO em 7 dias de reação, nos dois reatores. Nos reatores com 3 g/L de glicose a eficiência foi menor, com remoção de DQO no 7º dia de reação de 34%. Como foi feita a análise de DQO total, e não solúvel, pode ter ocorrido influência do maior crescimento da biomassa, nestes reatores, nos valores de DQO, fazendo diminuir a eficiência. Nos reatores com ausência de glicose a remoção foi de 31%. Foi observado crescimento de biomassa no reator de controle e, portanto, houve consumo de

matéria orgânica, resultando em uma remoção de DQO de 28% no 7º dia de reação. Na Tabela 9 são mostrados os percentuais de remoção de DQO nos três tempos de reação estudados para todos os reatores operados nesta etapa.

Tabela 9 – Remoção de DQO em percentual.

Reator	Remoção de DQO		
	2 dias	4 dias	7 dias
0,5 g/L de glicose	5%	42%	48%
1 g/L de glicose	4%	37%	48%
3 g/L de glicose	1%	14%	34%
Ausência de glicose	1%	29%	31%
Controle	1%	26%	28%

Pinheiro *et al.* (2010) submeteram um meio aquoso contendo 250 mg/L de fenol e macro e micronutrientes ao tratamento em reator de leito fixo e escoamento contínuo, inoculado com *Aspergillus niger*. O reator foi operado sob tempo de detenção hidráulica de oito horas, dividido em duas fases de alimentação: na ausência e presença de 0,5 g/L de glicose no meio. As remoções médias de matéria orgânica, medida em DQO, foram de 92% na presença da glicose e de 77% na ausência de glicose. Estes resultados mostram que a presença de um cossubstrato foi importante para o desempenho do reator, aumentando a eficiência do sistema quanto à remoção de matéria orgânica. No presente trabalho, a presença do deste açúcar também influenciou positivamente a eficiência de remoção de matéria orgânica, especialmente nas concentrações de 0,5 e 1,0 g/L glicose. Com a adição desta segunda fonte de carbono, quantidade suficiente de biomassa foi formada para agir sobre o composto alvo. Já com a concentração de 3 g/L de glicose, houve diminuição da eficiência, indicando que esta concentração foi de açúcar excessiva.

Na Figura 14 estão apresentados os valores de DQO medidos em todos os tempos de reação estudados, onde se pode observar que no primeiro tempo de reação estudado (2 dias) não ocorreu grande variação de DQO em relação à DQO inicial. No segundo tempo de reação estudado (4 dias), foi observada uma diminuição da concentração de DQO em todos os reatores, sendo mais acentuada nos reatores com 0,5 g/L de glicose (de 873 mg/L para 534 mg/L), e em seguida, nos reatores com 1,0 g/L de glicose (de 931 mg/L para 614 mg/L). No terceiro e último tempo de reação estudado (7 dias), em relação ao segundo tempo, a

diminuição da DQO mais acentuada aconteceu nos reatores com 3,0 g/L de glicose (de 945 mg/L para 721 mg/L).

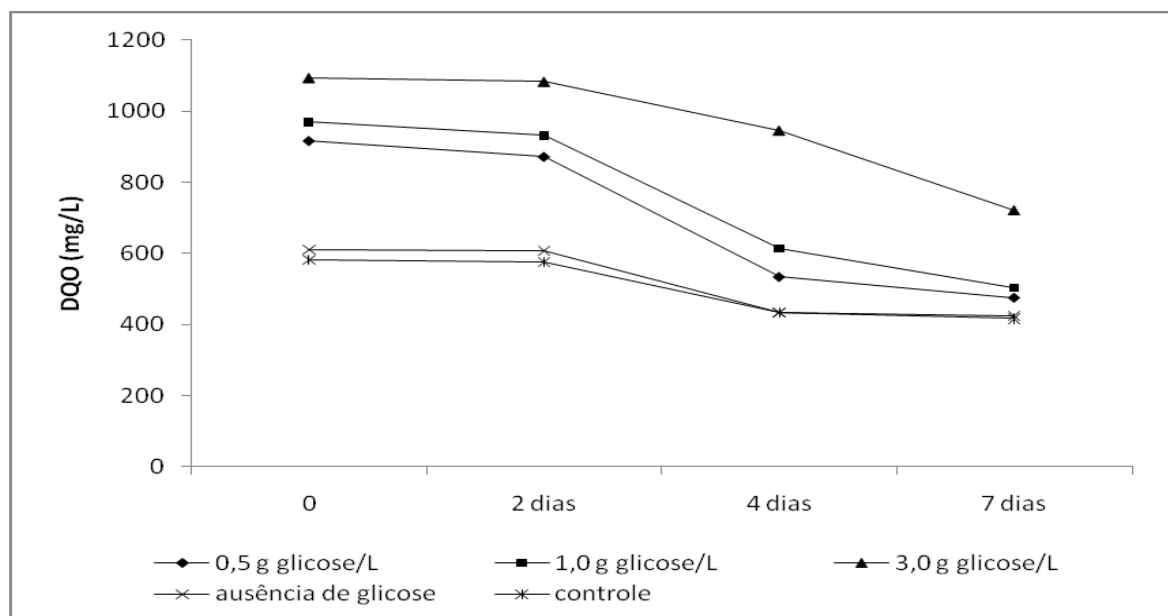


Figura 14 – Concentração de DQO nos reatores em batelada sob aeração para os tempos de reação estudados para uma concentração inicial de 5% da solução estoque.

Os resultados das análises de DQO do meio mineral sintético mais a glicose nas três concentrações utilizadas na pesquisa, 0,5, 1,0 e 3,0 g/L de glicose, resultaram em 308, 356 e 488 mg/L de DQO, respectivamente. Quando verificamos o decaimento da DQO pela diferença entre a concentração de DQO do efluente sintético na partida do experimento (tempo zero) e em cada tempo de reação (2 dias, 4 dias e 7 dias), constatamos que o consumo dos fármacos como fonte de carbono pelos fungos pode não ter ocorrido em determinados pontos do experimento. Isso porque, segundo Griffin (1994), os fungos têm preferência pela glicose como fonte de carbono, e o decaimento da DQO não foi maior que a concentração de DQO referente apenas à glicose no reator com 3,0 g/L de glicose, em nenhum dos tempos de reação estudados. Só é possível afirmar que houve consumo dos fármacos como fonte de carbono aos 4 e aos 7 dias de reação no reator 0,5 g/L de glicose. No reator com 1,0 g/L de glicose, é possível afirmar que ocorreu o consumo dos fármacos pelo fungo aos 7 dias de reação.

Gauthier *et al.* (2010) estudaram a biodegradação dos fármacos carbamazepina, sulfametizola, sulfametoxazola, trimetropim, metoprolol e dimetil sulfoxida por *Rhodococcus rhodochrous* e *Aspergillus niger* por co-metabolismo, com a adição de glicose

como fonte de carbono prontamente assimilável pelos micro-organismos. Seus resultados mostraram que os fármacos, que são de difícil degradação, podem se tornar mais suscetíveis à biodegradação se uma fonte de carbono de fácil assimilação estiver presente no meio. Entre os seis compostos utilizados na pesquisa citada, o *Aspergillus niger* foi capaz de biodegradar 9% da carbamazepina em dez dias. Os micro-organismo utilizados não foram capazes de crescer com os fármacos como única fonte de carbono, diferentemente da linhagem fúngica utilizada no presente trabalho, *Aspergillus niger* AN400, que se mostrou mais versátil, pois foi capaz de crescer em meio contendo somente os fármacos como fonte de carbono.

Uma vez que os efluentes farmacêuticos normalmente contêm grande quantidade de compostos tóxicos e/ou recalcitrantes, se faz necessário o emprego de pré-tratamento químico como uma forma de aumentar a biodegradabilidade destes compostos. Alguns estudos recentes avaliam a combinação de processos químicos e biológicos no tratamento destes efluentes.

Alaton *et al.* (2004), estudaram a combinação de oxidação química e biológica de efluente de formulação de penicilina. O efluente utilizado no estudo apresentava 830 mg/L de DQO e pH 6,9. O efluente foi submetido a ozonização (dose de ozônio aplicada = 2500 mg/(L x h) variando o pH (2,5 – 12,0) e peroxonização em diferentes concentrações iniciais de H₂O₂ (2 – 40 mM) e pH 10,5. Depois de estabelecidas as condições ótimas de ozonização e peroxonização, as águas residuárias brutas, ozonizadas e peroxonizadas, foram submetidos a tratamento biológico por lodos ativados. As maiores eficiências de remoção de DQO foram 56% no processo de ozonização (pH 12,0), 83% no processo de peroxonização (20 mM de H₂O₂ e pH 10,5) e 71%, 81% e 72% no processo de lodos ativados com o efluente bruto da formulação de penicilina bruto, ozonizado ou peroxonizado, respectivamente.

Quanto à variação do pH, observou-se diminuição do valor desta variável nos reatores que receberam adição de glicose. Quanto maior a concentração inicial de glicose no meio, mais acentuada a diminuição dos valores de pH, como pode ser visto na Figura 15.

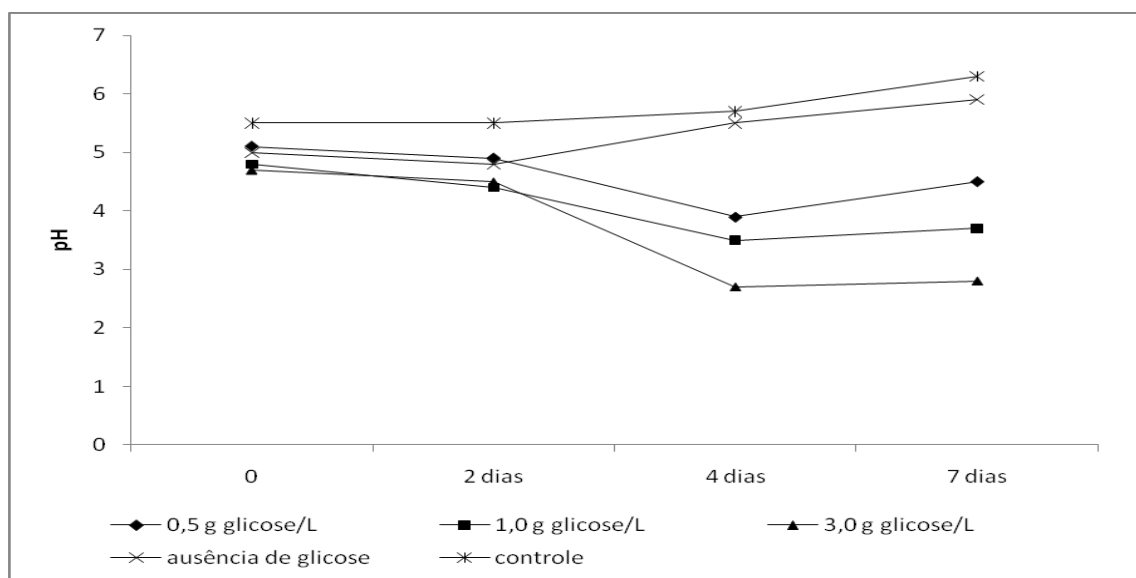


Figura 15 – Variação de pH nos reatores em batelada com biomassa dispersa sob aeração em cada tempo de reação estudado.

A diminuição do pH do efluente pode estar relacionada a produção de ácidos orgânicos pelos fungos, assim como pelo consumo preferencial de nitrogênio amoniacal quando amônia e nitrato encontram-se presentes no meio (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

5.4 ETAPA II

Na Figura 16 está apresentado o percentual de remoção de matéria orgânica, em termos de DQO, alcançado por cada reator em todos os tempos de reação estudados, nesta etapa. O melhor desempenho quanto à remoção de matéria orgânica (82%) ocorreu nos reatores que foram alimentados com solução de 2% da solução estoque e 0,5 g/L de glicose no tempo reacional de 6 dias. Entretanto, esta eficiência caiu nos tempos de reação subsequentes para 58% (9 dias) e 55% (12 dias).

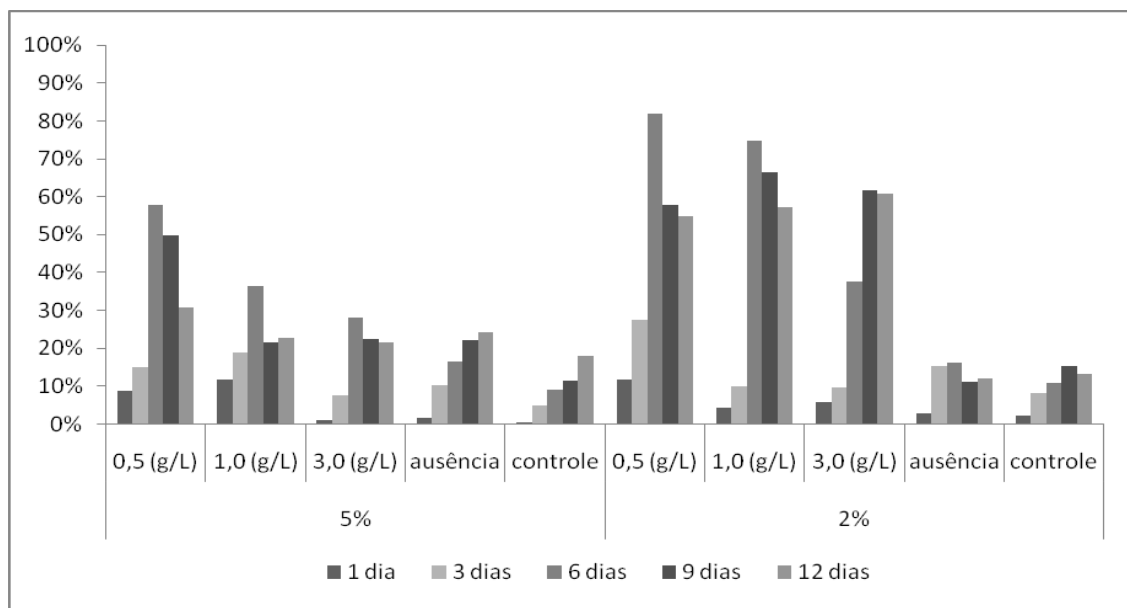


Figura 16 – Eficiência % de remoção de matéria orgânica, medida em DQO, pelos reatores em batelada sob agitação nos tempos de reação estudados neste estudo.

Alguns compostos podem ser degradados aleatoriamente, como resultado do cometabolismo de populações microbianas, consumindo outras fontes de carbono mais facilmente degradáveis, e este mecanismo muitas vezes leva ao acúmulo de metabólitos estáveis (EVANGELISTA *et al.* 2010). Esta pode ser a explicação para o aumento da concentração de DQO nos reatores que receberam adição de glicose após o nono dia de reação nos dois lotes de reatores.

Considerando-se que os fungos preferem a glicose como fonte de carbono em detrimento de outros compostos orgânicos (GRIFFIN, 1994) e que as análises de DQO do meio mineral sintético mais a glicose nas três concentrações utilizadas na pesquisa, 0,5, 1,0 e 3,0 g/L, resultaram em 308, 356 e 488 mg/L de DQO, respectivamente, pôde-se verificar que em alguns pontos desta etapa é possível afirmar que ocorreu o consumo dos poluentes como fonte de carbono pelo fungo. No lote de reatores com efluente contendo 5% da solução estoque de fármacos, a degradação dos poluentes só ocorreu com a menor concentração inicial de glicose (0,5 g/L) a partir do sexto dia de reação. No lote de reatores contendo 2% da solução estoque de fármacos, a degradação dos poluentes teria ocorrido nos reatores com as três concentrações de glicose utilizadas (0,5, 1,0 e 3,0 g/L), pois foi observado que o decaimento da DQO foi maior que a DQO resultante apenas da glicose a partir do sexto dia de reação nos reatores com 0,5 e 1,0 g/L de glicose e do nono dia de reação no reator com 3,0

g/L de glicose. Portanto, com a diminuição da concentração dos fármacos de 5% para 2% da solução estoque, não ocorreu inibição da degradação dos fármacos por excesso de substrato.

Demir *et al.* (2007) utilizaram inóculo de *Phanerochaete chrysosporium* para remover o corante Amarelo Remanzol em meio aquoso enriquecido com nutrientes. A fim de obter a quantidade de cossubstrato ótima, variando concentração de glicose em 1, 2 e 5 g/L. O processo foi realizado em reatores aeróbios de 250 mL com volume reacional de 100 mL. Os estudos de descoloração foram realizados a 37 °C e rotação de 150 rpm por 48 horas. Nesse tempo de reação o sistema removeu 93%, 96% e 67% de matéria orgânica para as concentrações de 1, 2 e 5 g/L de glicose, respectivamente.

Nas Figuras 17 e 18 estão apresentados os valores de DQO medidos em todos os tempos de reação estudados nos dois lotes de reatores.

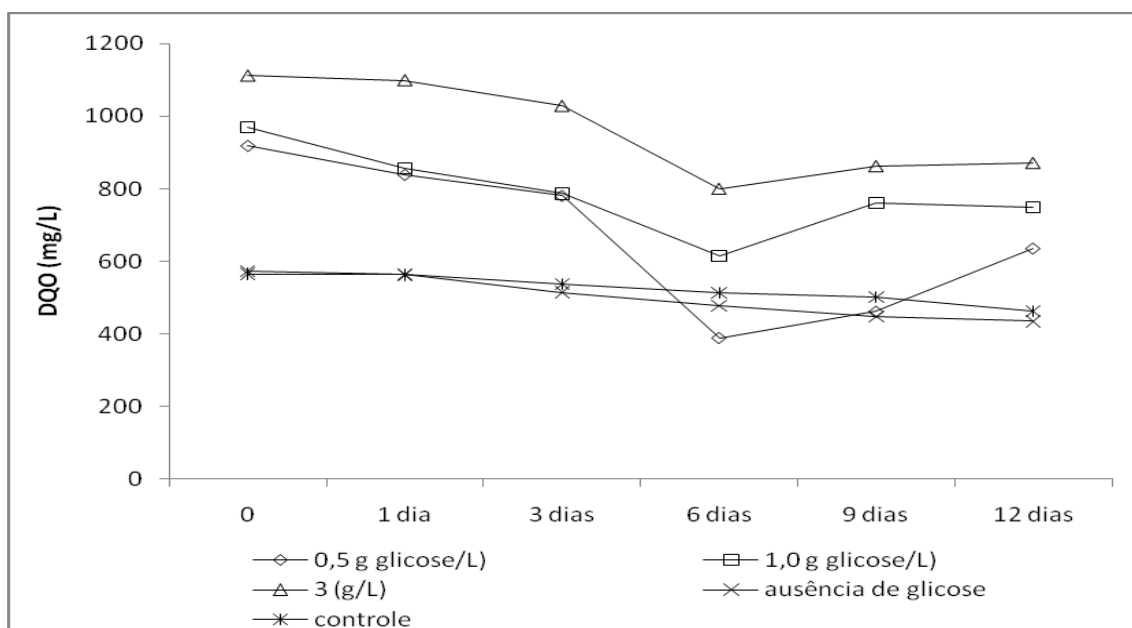


Figura 17 – Concentração de DQO, em cada tempo de reação estudado, nos reatores em batelada sob agitação com concentração inicial de 5% da solução estoque de fármacos.

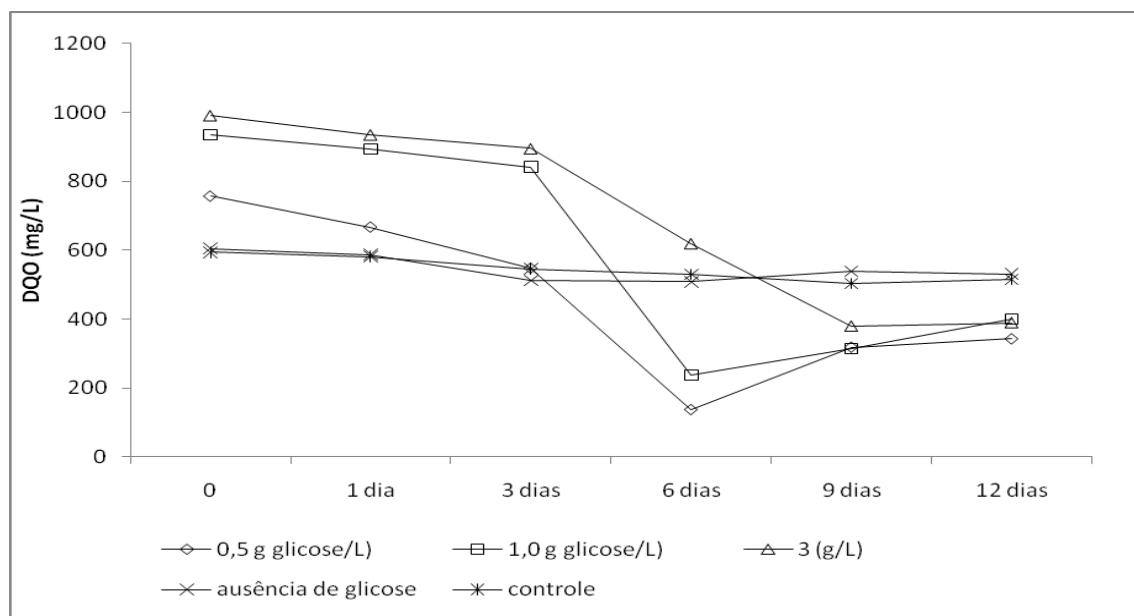


Figura 18 – Concentração de DQO, em cada tempo de reação estudado, nos reatores em batelada sob agitação com concentração inicial de 2% da solução estoque de fármacos.

Os resultados da análise de SSV, feita para verificar o crescimento da biomassa em cada reator estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Biomassa formada nos reatores medida em SSV.

Reatores	SSV (mg/L)	
	5%	2%
0,5 g/L de glicose	353	332
1 g/L de glicose	307	383
3 g/L de glicose	316	474
Ausência de glicose	174	187
Controle	166	156

Os reatores de controle e com ausência de glicose nos dois lotes apresentaram pequeno crescimento de biomassa, de forma dispersa, como pode ser visto nas Figuras 19, 20, 21, e 22. Isto demonstra a capacidade do *Aspergillus niger* de crescer em meio contendo apenas os fármacos como fonte de carbono. Entretanto, a falta de uma fonte de carbono de mais fácil assimilação pelo fungo faz com que o crescimento da biomassa seja insuficiente para ocasionar uma maior remoção de matéria orgânica do efluente, a ponto de haver degradação significativa dos poluentes.



Figura 19 – Crescimento microbiano no reator controle com efluente contendo 2% da solução estoque.



Figura 20 – Crescimento microbiano no reator controle com efluente contendo 5% da solução estoque.



Figura 21 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 5% da solução estoque e ausência de glicose.



Figura 22 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 2% da solução estoque e ausência de glicose.

No lote de reatores com efluente contendo 5% da solução estoque de fármacos que receberam adição de glicose, o reator com 0,5 g/L deste cossubstrato apresentou crescimento elevado de biomassa, tanto na forma de pellets heterogêneos como formando biofilme. O biofilme formado permaneceu aderido à parede do frasco até o terceiro dia de reação, e em seguida desprende-se do vidro (Figura 23). No reator com 1,0 g/L de glicose, deste mesmo lote, o crescimento da biomassa seguiu padrão semelhante ao do reator com 0,5 g glicose/L, entretanto resultando em menor quantidade de biomassa e formando pellets de menor dimensão (Figura 24). Ainda referente a este lote de reatores, no reator com 3,0 g/L de glicose, também houve formação de biofilme inicialmente aderido à parede do frasco, que

desprende-se do vidro aos três dias de reação. Neste reator, não foi observado crescimento na forma peletizada (Figura 25).



Figura 23 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 5% da solução estoque e 0,5 g/L de glicose.



Figura 24 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 5% da solução estoque e 1,0 g/L de glicose.



Figura 25 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 5% da solução estoque e 3,0 g/L de glicose.

No lote de reatores com efluente contendo 2% da solução estoque de fármacos com adição de glicose, o reator com 0,5 g/L do cossubstrato apresentou crescimento de biomassa inicialmente na forma de biofilme, que encontrava-se aderido à parede do frasco até o terceiro dia de reação, tendo se desprendido do vidro e ficado solto no meio, semelhante a uma manta. Houve também a formação de apenas dois pellets de grande dimensão (Figura 26). Nos reatores com 1,0 e 3,0 g/L de glicose deste lote, repetiu-se este padrão de crescimento da biomassa. No entanto, nestes reatores, o crescimento do fungo foi mais acentuado, com formação de elevado número de pellets de grande dimenssão e manta espessa (Figuras 27 e 28).



Figura 26 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 2% da solução estoque e 0,5 g/L de glicose.



Figura 27 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 2% da solução estoque e 1,0 g/L de glicose.



Figura 28 – Crescimento microbiano no reator com efluente contendo 2% da solução estoque e 3,0 g/L de glicose.

A morfologia de *Aspergillus*, na forma de crescimento filamentoso e/ou na forma de crescimento peletizada, é influenciada por muitos fatores, incluindo propriedades específicas da linhagem, mas também fatores ambientais tais como número de esporos do inóculo ou tipo do inóculo, composição do meio, concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, tipo e escala do reator e intensidade de agitação (EL-ENSHASY *et al*, 2006).

Aeração e agitação são de importância primordial no cultivo aeróbio. Maiores taxas de aeração e agitação causam dois efeitos principais sobre o cultivo de fungos filamentosos em reator agitado. Por um lado, melhor mistura e maior oferta de oxigênio, assim como maior transferência de massa e calor. Entretanto, maiores intensidades de aeração e agitação levam a

um maior insumo de energia e também maior estresse mecânico, causando alterações morfológicas, variações de crescimento da biomassa e formação de produtos (LIN *et al*, 2010).

As variações de pH ocorridas nos reatores dos dois lotes podem ser observadas nas Figuras 29 e 30. Nos reatores que receberam adição de glicose, este parâmetro apresentou tendências de variação semelhantes, em que os valores de pH diminuíram até o sexto dia de reação, aumentando nos tempos de reação subsequentes. Os valores de pH nos reatores com ausência de glicose e controle também diminuíram até o sexto dia de reação e aumentaram nos tempos de reação subsequentes, mas com variação menor que nos demais reatores.

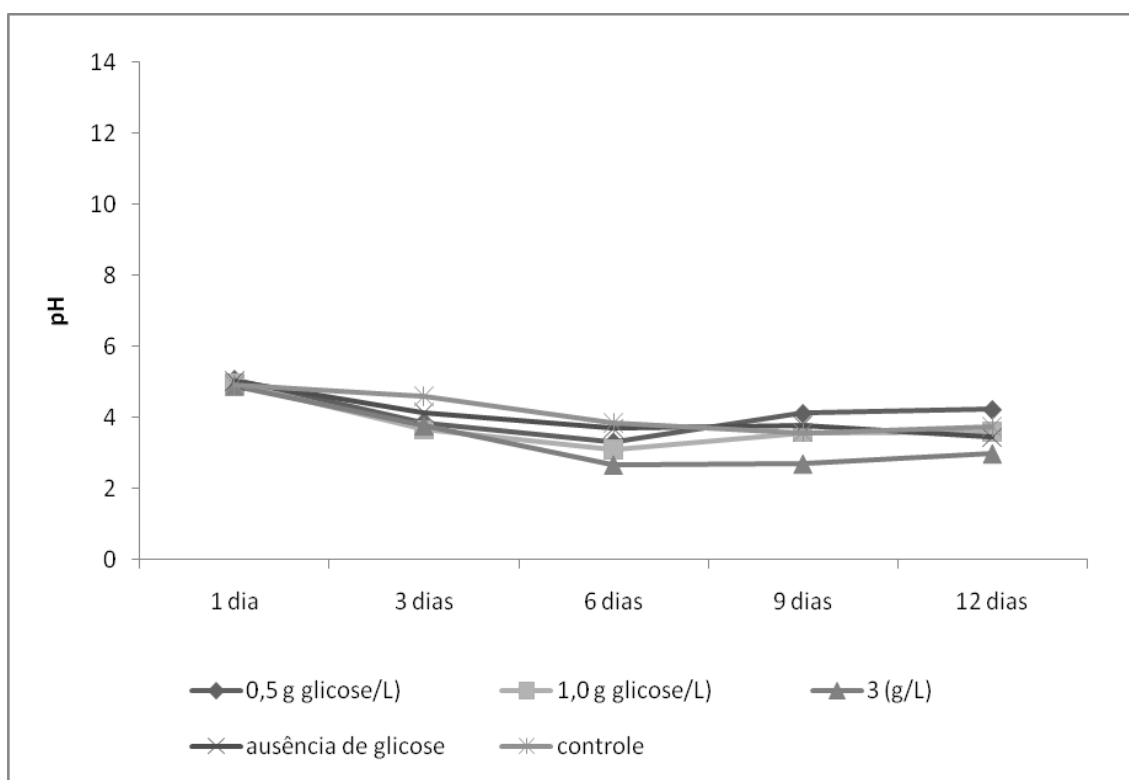


Figura 29 – Variação de pH nos reatores com efluente contendo 5% da solução estoque de fármacos

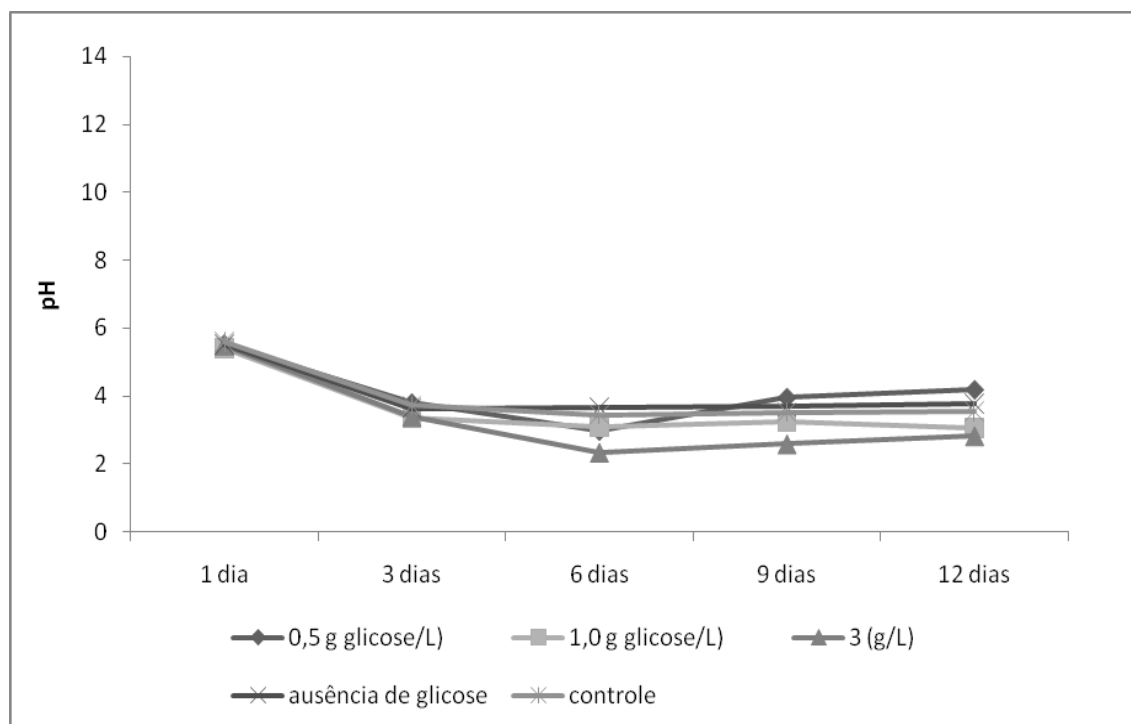


Figura 30 – Variação de pH nos reatores com efluente contendo 2% da solução estoque de fármacos

Como já relatado no item 3.3, a diminuição do pH do efluente pode estar relacionada à produção de ácidos orgânicos pelos fungos e/ou pelo consumo preferencial de nitrogênio amoniacal quando amônia e nitrato encontram-se presentes no meio (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). O aumento dos valores do pH que ocorreu a partir do sexto dia de reação, que coincidem com o aumento da concentração de DQO nos reatores, provavelmente devido ao acúmulo de metabólitos estáveis. Outra explicação para este fato, associada ao metabolismo de assimilação do nitrogênio pelo fungo, seria uma interrupção da agitação dos reatores por cerca de 12 horas, ocasionada por uma queda de energia elétrica. A interrupção da agitação teria resultado na diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, gerando situação de hipoxia nos reatores, em que pode ocorrer metabolização de nitrato em via desassimilatória para formar amônia e óxido nitroso num processo de rendimento de energia (ZHOU et al, 2001).

5.5 ETAPA III

Nas Figuras 31 e 32 estão apresentados, respectivamente, o reator utilizado nesta etapa da pesquisa, na partida e no final do ciclo 3.



Figura 31 – Reator em batelada sequencial no momento da partida do ciclo três para a degradação biológica com biomassa imobilizada.



Figura 32 – Reator em batelada sequencial com ao final do ciclo três.

As variações da concentração de matéria orgânica, quantificada pela análise de DQO, e os percentuais de remoção de matéria orgânica nos cinco tempos de reação de cada um dos seis ciclos estudados estão apresentadas nas Figuras 33 e 34, respectivamente.

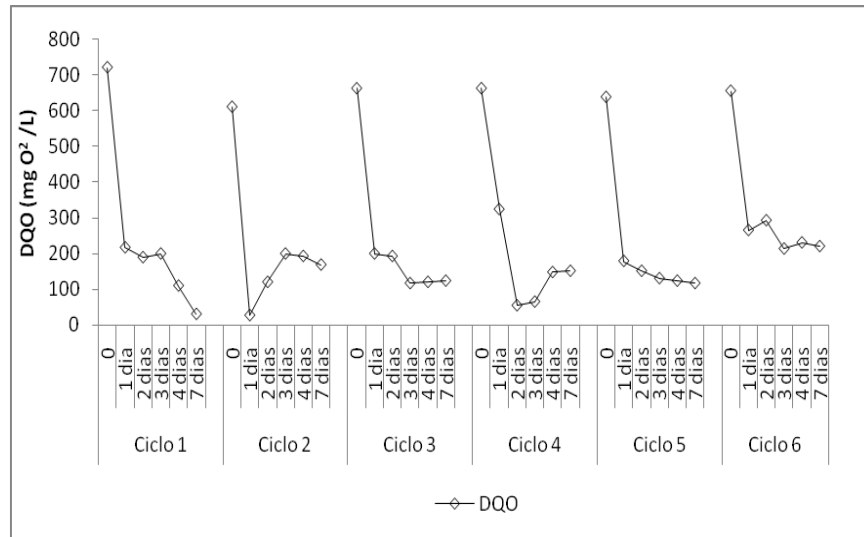


Figura 33 – Variação da concentração de DQO nos cinco tempos de reação em cada um dos seis ciclos estudados.

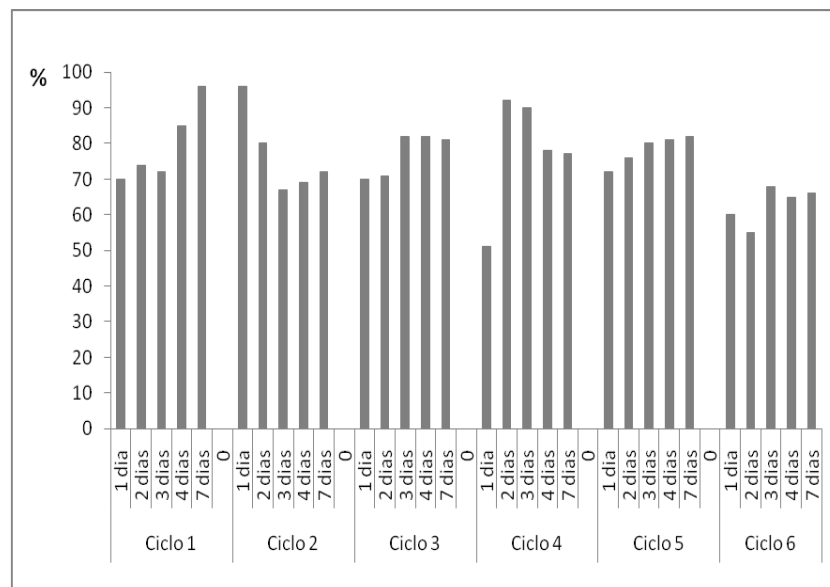


Figura 34 – Percentual de remoção de matéria orgânica, medida em termos de DQO, nos cinco tempos de reação em cada um dos seis ciclos estudados.

A remoção média de matéria orgânica em todo o experimento foi de 75%. As maiores remoções individuais ocorreram no ciclo 1, com sete dias de reação, e no ciclo 2, com 1 dia de reação, as quais foram de 96%. Durante o ciclo 4 ocorreram altas remoções, acima de 90%, com dois (92%) e três dias de reação (90%). As menores remoções ocorreram durante o ciclo 6, cuja remoção final foi de 63%. Os ciclos 3 e 5 apresentaram remoções de matéria orgânica próximas, com reduções de 77% e 78%, respectivamente.

Comparando-se a variação de DQO em cada ciclo, foi possível perceber que, já no primeiro tempo de reação (1 dia) houve uma diminuição significativa da concentração de matéria orgânica no efluente, com uma a remoção média de DQO, neste tempo de reação, em todos os ciclos, de 70%.

No último ciclo (ciclo 6) ocorreu uma diminuição da remoção média de matéria orgânica, correspondente a 62%, em relação à média de remoção dos demais ciclos.

A estrutura típica do biofilme microbiano inclui uma complexa arquitetura tridimensional caracterizada por espaços intersticiais e canais de água com células geralmente encapsuladas em uma matriz extracelular (STOODLEY *et al.* 2002). A perda de eficiência média de remoção de DQO pode ocorrer pela produção excessiva de biomassa e de material mucilagenoso. A mucilagem, que compõe a matriz extracelular do biofilme, é geralmente composta de polissacarídeos extracelulares, proteínas e glicoproteínas, com propriedades adesivas, que ajudam na fixação ao suporte e tem a função de proteger os micro-organismos do efeito tóxico de poluentes (COSTA *et al.* 2004).

O crescimento excessivo de biomassa e mucilagem pode comprometer o transporte de nutrientes no biofilme, o que ocasiona prejuízos quanto à produção de enzimas catabólicas (PINHEIRO *et al.* 2010). A diminuição da atividade enzimática dos micro-organismos pode contribuir para diminuir a eficiência de remoção de matéria orgânica em sistemas de tratamento biológico dessa natureza.

Outro fator que pode determinar a diminuição da atividade enzimática é a idade do biofilme, uma vez que células mais antigas podem sofrer alterações morfológicas ao longo do tempo, comprometendo, assim, a atividade enzimática e, por consequência, a eficiência do processo de tratamento. (BLANQUEZ *et al.* 2006).

Em relação às variações de pH no reator em batelada sequencial, como pode-se observar na Figura 35, os valores não sofreram grandes alterações. Quando ocorreram remoções de matéria orgânica mais acentuadas, concomitantemente ocorreu leve diminuição do pH, o que se explica pela produção de ácidos orgânicos pelo fungo.

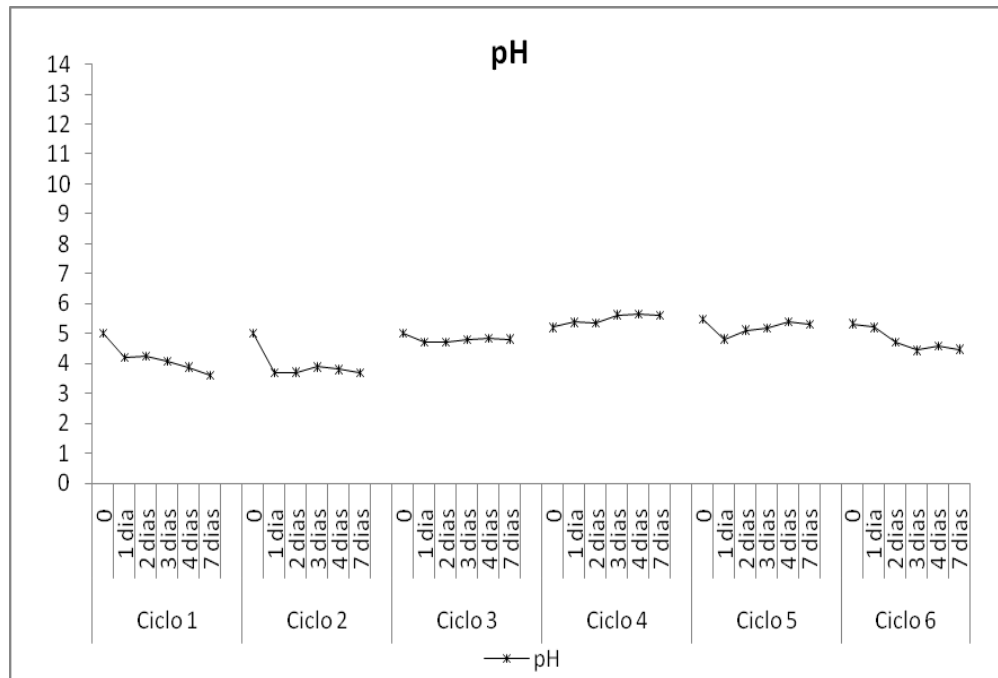


Figura 35 – Variações de pH no reator em batelada sequencial ao longo dos seis ciclos estudados.

6. CONCLUSÕES

Através do teste prévio de inibição de *Aspergillus niger* AN400 pela água residuária sintética rica em fármacos pôde-se constatar que o *Aspergillus niger* é capaz de assimilar os compostos farmacêuticos empregados nesta pesquisa como única fonte de carbono. Entretanto, em concentrações mais elevadas destes compostos, o fungo apresenta crescimento inibido.

A análise da eficiência de remoção de matéria orgânica de água residuária sintética, rica em compostos farmacêuticos, em reatores em batelada sob aeração artificial, na ausência e na presença de glicose como cossubstrato, mostrou que as diferentes concentrações de glicose empregadas resultaram em diferentes formas de crescimento da biomassa fúngica. As melhores eficiências de remoção aconteceram na presença da glicose, mas na menor concentração empregada (0,5 g/L), correspondente a redução de DQO original de 48%.

A análise dos reatores em batelada sob agitação, quanto à eficiência de remoção de matéria orgânica de água residuária sintética, rica em fármacos em duas concentrações diferentes, na ausência e na presença de glicose como cossubstrato, novamente mostrou que as diferentes condições empregadas resultaram em diferentes formas de crescimento da biomassa de *Aspergillus niger*. A menor concentração de fármacos propiciou maiores eficiências de remoção, também na presença das menores concentrações de glicose empregadas (0,5 e 1,0 g/L).

A análise do desempenho do reator em batelada sequencial na remoção de matéria orgânica de água residuária sintética, rica em fármacos, mostrou que esta configuração de reator resultou nos melhores percentuais de remoção para as três etapas da pesquisa. A remoção média de matéria orgânica foi de 75%, e as maiores eficiências isoladas ocorreram no ciclo 1, com sete dias de reação, e no ciclo 2, com 1 dia de reação, correspondentes a 96% de redução da DQO original.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Analisar a concentração isolada dos compostos farmacêuticos ao longo do experimento.

Verificar se há a formação de metabólitos como subprodutos da degradação dos fármacos.

Verificar a influência do tamanho do inóculo de *Aspergillus niger* na remoção de fármacos.

Para a configuração em bateladas sequenciais, verificar a eficiência deste na remoção de matéria orgânica com ciclos mais curtos e por maior tempo operacional.

Avaliar o uso de processos de oxidação avançada como pré-tratamento do efluente farmacêutico a ser submetido ao reator contendo fungos.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, H. S. F. **Remoção de corante têxtil em reator biológico com fungos**. I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. Natal – RN, 2006.
- APHA/AWWA/WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. Washington, D.C. American Health Association, 2005.
- ALANTON, A.; DOGRUEL, S.; BAYKAL, E.; GERONE, G. Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation. **Journal of Environmental Management**, v. 73, p. 155-163, 2004.
- BLANQUEZ, P.; SARRA, M.; VICENT, M. T. Study o the cellular retention time and the partial biomass renovation in a fungal decolourisation continuous process. **Water Research**, v. 40, p. 1650-1656, 2006.
- BOXALL, A. B. A.; KOLPIN, D. W.; HALLING-SORENSEN, B., TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science Technology**, v.37, p. 286-294, 2003.
- BOYD, R. A.; FURLONG, E. T. Human-Health Pharmaceutical Compounds in Lake Mead, Nevada and Arizona, and Las Vegas Wash, Nevada, October 2000—August 2001. **US Geological Survey, Reston**, v. A, p. 1–18, 2002.
- CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, v.142, p. 185-194, 2003.
- COSTA, J. M.; CORBELLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L. Study of different nitrogens sources on glucose uptake and production of melanin precursos and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultered in tricyclazole. **Process Biochemistry**, v.39, p. 633-636, 2004.
- DAUGHTON, C.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environ. Health Perspect**, v. 107, p. 907–938, 1999.

DBSKA, J.; KOT-WASIK, A.; NAMIENIK, J. Fate and Analysis of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 1, 51 – 67, 2004.

DEMIR, G.; OZCAN, H. K.; OZCAN, B. M. Decolorization of Remazol Yellow RR Gran by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, p. 813-817, 2007.

DENG, A.; MARKUS, H.; QING-ZHI, Z.; SIEGFRIED, F.; MANFRED, S.; WOLFGANG, B.; REINHARD, N.; e DIETMAR, K. Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS, **Environmental science & technology**, v. 37, p. 3422-3429, 2003.

DIETRICH, D.R.; WEBB, S.F. PETRY, T. Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 1–3, 2002.

ENICK, O. V.; MOORE, M. M. Assessing the assessments: pharmaceuticals in the environment. **Environmental Impacts Assess.** v. 27, p. 707–729, 2007.

ERICKSON, B. E. Analusing the ignored environmental contaminants. **Environmental Science Technology**, v. 36, p. 140-145, 2002.

EVANGELISTA, S.; COOPER, D. G.; YARGEAU, V. The effect of structure and a secondary carbon source on the microbial degradation of chlorophenoxy acids. **Chemosphere**, v. 79, p. 1084-1088, 2010.

FERRARI, B.; PAXÉUS, N.; LO GIUDICE, R.; POLLIO, A.; GARRIC, J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewater: study of carbamazepize, clofribic acid and ciclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55 p. 359–370, 2003.

EL-ENSHASY, H.; KLEINE, J.; RINAS, U. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growths forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry** v. 41, p. 2103-2112, 2006.

ESPOSITO, E. E AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, p. 510, 2004.

GARCIA-PEÑA, E. I.; HERNANDEZ, S.; FAVELA-TORRES, E.; AURIA, R.; REVAH, S. Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. **Biotechnology Bioengineering**. v. 76, p. 61–69, 2001.

GAUTIER, H.; YARGEAU, V.; COOPER, D. G. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. **Science of the Environment**, v. 408, p. 1701-1706, 2010.

GONZÁLEZ, O.; ESPLUGAS, M.; SANS, C.; TORRES, A.; ESPLUGAS, S. Performance of a Sequencing Batch Biofilm Reactor for the treatment of pre-oxidized Sulfamethoxazole solutions. **Water Research**. n. 43, p. 2149–2158, 2009.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

GUERRERO-PRESON, R.; BRANDT-RAUF, P. Pharmaceutical residues in the drinking water supply: modeling residue concentration in surface Waters of drugs prescribed in the United States. **Puerto Rico Health Science Journal**, v. 27, p. 236-240, 2008.

GUTIERREZ, M.; EXTEBARRIA, J.; de las FUENTAS, L. Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox® and activated sludge oxygen uptake inhibition. **Water Resource**, v. 36, p. 919-, 2002.

HALLING-SORENSEN, B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. **Chemosphere**, v. 40, p. 731-739, 2000.

HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN LU TZHOFT, H. C.; JORGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. **Chemosphere**, v. 36, p. 357–393, 1998.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 466-485, 2007.

HILLE, A.; NEU, T. R.; HEMPEL, D. C.; HORN, H. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 92, p. 614–623, 2005.

IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, N. J.; EL-DIN, M. G. Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, p. 353 – 414, 2006.

JONES, O. A.; LESTER, J. N.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? **Trends Biotechnology**, v. 23, p. 163–167, 2005.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environmental International**, v.35, p. 402–417, 2009.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceutical hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science Technology**, v. 36, p. 1202-, 2002.

KULIK, N.; TRAPIDO, M.; GOI, A.; VERESSININA, Y.; MUNTER, R. Combined chemical treatment of pharmaceutical effluents from medical ointment production. **Chemosphere**, v. 70, p. 1525–1531, 2008.

KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. **Chemosphere**, v. 40, p. 701–710, 2000.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 5-7, 2003.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 2354–2366, 2009.

ter LAAK T. L., WOUTER A. G., TOLLS J. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 25, p. 904–911, 2006.

LIENERT, J.; GÜDEL, K.; ESCHER, B. I. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 4471–4478, 2007.

LIN, P.; SCHOLZ, A.; KRULL, R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 213–220, 2010.

MELERO, J. A.; MARTÍNEZ, F.; BOTAS, J. A.; MOLINA, R.; PARIENTE, M. I. Heterogeneous catalytic wet peroxide oxidation systems for the treatment of an industrial pharmaceutical wastewater. **Water Research**, v. 43, p. 4010–4018, 2009.

MIÈGE, C.; CHOUBERT, J. M.; RIBEIRO, L.; EUSÈBE, M.; COQUERY, M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 1721–1726, 2009.

OPPENHEIMER, J.; STEPHENSON, R.; BURBANO, A.; LIU, I. (2007). Characterizing the passage of personal care products through wastewater treatment processes. **Water Environmental Resource**, v. 79, p. 2564–77, 2007.

PAUWELS, B.; VERSTRAETE, W. The treatment of hospital wastewater: na appraisal. **Water Health**, v. 4, p. 405–416, 2006.

PINHEIRO, Z. B.; RODRIGUES, K.; PESSOA-WANDERLEY, C. R.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G. Remoção biológica de fenol por uso de reator contínuo com inoculo de *Aspergillus niger*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, p. 47–52, 2010.

RINAS, U.; EL-ENSHASY, H. EMMLER, M.; HILLE, A.; HEMPEL, D.C.; HORN, H. Model based prediction of substrate conversion and protein synthesis and excretion in recombinant *Aspergillus niger* biopellets. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 2729–2739, 2005.

RODRIGUES, K. de A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. São Carlos. Tese de doutorado-Escola de engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2006.

RODRIGUES, K.; SILVA, K. M. L. da; SILVA, G. M. M.; LIMA, P. C. C. Remoção d corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas seqüenciais. **Química Nova**, vol. 34, n. 7, 1-5, 2001.

SAMPAIO G. M. M. S.; SANTOS, E. M. A.; LEITÃO, R. C.; FACÓ, A. M; MENEZES, E. A.; SANTAELLA, S. T. Pós-Tratamento de efluentes de um reator UASB através de um reator biológico com fungos. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 73-81, 2004.

SANTOS, E. M. A.; SAMPAIO, G. M. M. S.; LEITÃO, R. C.; FACÓ, A. M; MENEZES, E. A.; SANTAELLA, S. T. Influência do tempo de detenção hidráulica em um sistema UASB seguido como um reator biológico com fungos para tratar efluentes de indústria de castanha de caju. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 11, n. 1, p. 39-45, 2006.

SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, p. 325-335, 2003.

SILVA FILHO, H. A. **Remoção de corante têxtil em reator biológico com fungos**. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Gestão em Tecnologia Ambiental) – Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará (CEFETCE), Fortaleza, 2006.

STACKELBERG, P.; FURLONG, E.; MEYER, M.; ZAUGG, S.; HENDERSON, A.; REISSMAN, D. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 329, p. 99–113, 2004.

STOODLEY, P.; SAVER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as a complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**. v. 56, p. 187-209, 2002.

SUMAN RAJ, D. S.; ANJANEYULU, Y. Evaluation of biokinetic parameters for pharmaceutical wastewaters using aerobic oxidation integrated with chemical treatment. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 165–175, 2005

VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters Applied of Microbiology**, v. 45, p. 231-237, 2007.

VILLENA, G. K.; FUJIKAWA, T.; TSUYUMU, S.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. (2010) Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. **Bioresourse Technology**, v. 101, p. 1920-1926, 2010.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, p. 723-730, 2000.

ZHOU, Z.; TAKAYA, N.; NAKAMURA, A.; YAMAGUCHI, M.; TAKEO, K. Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 227, p. 1892-1892, 2001.

ZWIENER, C.; RICHARDSON S. D.; DEMARINI D. M. (2007) Drowning in disinfection byproducts? Assessing swimming pool water. **Environmental. Science & Technology**, v. 41, p. 363-372, 2007.