

## II-540 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTE BRUTO CONTAMINADO COM NORFLOXACINO E TRATADO POR PROCESSO DE OZONIZAÇÃO

**Danusa Campos Teixeira<sup>(1)</sup>**

Bacharel em Química/Habilitação para a Indústria pela Universidade Federal de Minas Gerais. Especialista Profissional em Engenharia de Avaliação Ambiental pela Universidade Estadual de Campinas. Mestranda em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais.

**Raquel Sampaio Jacob<sup>(2)</sup>**

Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Especialista em Saneamento e Meio Ambiente pela Universidade Federal de Minas Gerais. Mestranda em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos na Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Lucilaine Valéria de Souza Santos<sup>(3)</sup>**

Bacharel em Química pela Universidade Federal de Minas Gerais. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais. Doutoranda pela Universidade Federal de Minas Gerais.

**Lisete Celina Lange<sup>(4)</sup>**

Química. Doutora em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Londres, Inglaterra. Professora Associada do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha - Belo Horizonte – Minas Gerais - CEP: 31270-901-Brasil - Tel: (31) 3409-1880 - e-mail: danusa\_quimica@yahoo.com.br

### RESUMO

Uma grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Os antibióticos constituem um caso especial, isso porque, correspondem à maior categoria de fármacos utilizados na medicina e podem promover a resistência bacteriana de microorganismos em corpos d'água. A ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos, a exemplo dos fármacos. O objetivo desse trabalho foi proceder com a avaliação da toxicidade – através da bactéria *Vibrio fischeri* – de efluente contaminado com norfloxacinol antes e após tratamento por ozonização direta e indireta. Investigou-se a influência do pH e da dosagem de ozônio sobre o processo. Foi observada a rápida degradação para as condições estudadas de pH (3 e 10) e fluxo de ozônio (0,26 e 0,52 g/h). Além disso, atingiu-se 100% de remoção em tempo que variou entre 5 a 10 minutos de reação. No entanto, a mineralização não foi completamente alcançada. De acordo com os resultados de Carbono Orgânico Total (COT), subprodutos da oxidação foram gerados. A melhor remoção de COT foi apresentada pelo mecanismo indireto de oxidação. Com relação à ecotoxicidade, a oxidação indireta reduz a toxicidade da amostra, enquanto a direta aumenta.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ecotoxicologia, *Vibrio fischeri*, Ozonização, Fármacos, Norfloxacinol.

### INTRODUÇÃO

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

Os fármacos são projetados para atuar em vias metabólicas e moleculares específicas de humanos e animais, mas frequentemente exibem efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no meio ambiente podem afetar organismos que tenham estrutura similar aos humanos, bem como organismos com estruturas distintas, em que os mecanismos de ação desses químicos são desconhecidos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Nesse sentido, a ecotoxicologia aquática aparece como uma ciência de grande valia para dar suporte no

enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos, como fármacos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Um balanço realizado entre as concentrações de fármacos na entrada e saída das plantas de tratamento de esgotos e efluentes revela que durante o tratamento nem todos os fármacos são completamente removidos (TERNES, 1998). Os Processos Oxidativos Avançados (POA) vêm se mostrando hábeis na degradação e remoção de medicamentos, sendo frequentemente empregados na remediação de efluentes industriais, esgotos domésticos, águas de superfície, subsolo contaminados e lixiviado de aterros sanitários. Tratam-se de processos extremamente eficientes para mineralizar substâncias orgânicas de difícil degradação e em baixas concentrações (KRAUSE, 2009). Dentre os POA, o uso do ozônio tem sido bastante adotado para o tratamento de poluentes recalcitrantes, devido ao seu alto potencial de redução. A ozonização pode ser realizada pela aplicação de ozônio ou mesmo pela injeção do ozônio associado a catalisadores (ASSALIM; DURÁN, 2006; MAHMOUD, 2007). Tal processo de oxidação é pouco seletivo, uma vez que reage com toda a matéria orgânica presente na matriz e não apenas com os compostos que não são biodegradáveis. Isso significa que o processo pode ficar oneroso se a matriz não for previamente tratada por um processo biológico.

A eficiência de remoção da carga orgânica pode ser afetada pela variação da carga de ozônio e também pela variação do pH, o qual influencia diretamente na decomposição da molécula de ozônio. Em pH ácido, as reações acontecem predominantemente por ozônio molecular, as quais tendem a ser mais seletivas, já que a molécula de ozônio ataca as insaturações das moléculas orgânicas. Em pH básico, as reações de degradação são favorecidas pelo radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ). É a formação desse radical que caracteriza o Processo Oxidativo Avançado (COELHO, 2008). Além da variação do pH, a carga de ozônio injetada no efluente pode gerar compostos de diversos tipos, caso a mineralização não seja completa. Esses compostos podem apresentar toxicidade superior à do composto de origem. Esse é o principal motivo que justifica a análise da ecotoxicológica de efluentes tratados com Processos Oxidativos Avançados.

O objetivo desse trabalho foi proceder com a avaliação da toxicidade de efluente contaminado com norfloxacinol antes e após tratamento por ozonização direta e indireta em diferentes dosagens de ozônio.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para desenvolvimento do trabalho procedeu-se, inicialmente, com a preparação de efluente sintético com a concentração de 15 mg/L de Norfloxacinol (Figura 1). Esse efluente foi, então, submetido ao tratamento por ozonização. Após a realização do processo de tratamento, efetuou-se a análise ecotoxicológica com a bactéria *Vibrio fischeri* das amostras brutas e tratadas. A figura 2 apresenta um fluxograma das análises e procedimentos realizados nas amostras.

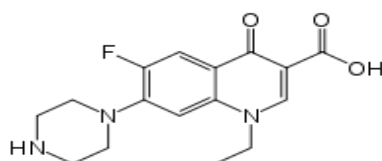
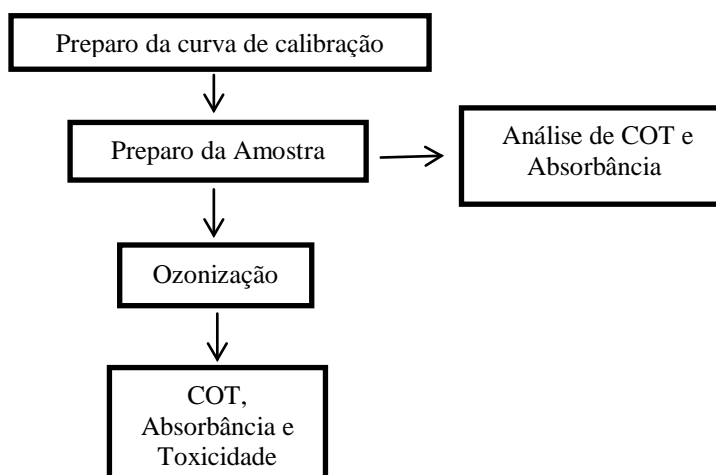


Figura 1: Fórmula Estrutural do antibiótico Norfloxacinol



**Figura 2: Fluxograma das análises e procedimentos adotados para os ensaios de degradação.**

#### *Curva de calibração de Norfloxacino*

Uma curva de calibração para o antibiótico foi desenvolvida em um espectrofotômetro de absorção molecular PerkinElmer, Modelo Lambda XL, onde foram medidas as absorbâncias de soluções de diferentes concentrações de Norfloxacino no comprimento de onda de absorção máxima 273 nm. O pH das soluções foram ajustados para 7, assim evitando o deslocamento da banda de absorção do composto.

#### *Ozonização*

Para o ensaio de ozonização, foi utilizado um reator cilíndrico de policloreto de vinila (PVC) de 2000 mL de volume, onde a mistura de ozônio/oxigênio foi borbulhada no efluente por um difusor de cerâmica instalado no fundo do reator. Os testes foram realizados em batelada, com duração de 60 minutos e temperatura ambiente. Os experimentos tiveram suas condições de pH e fluxo da mistura de gás variados, como mostrado na tabela 1. O fluxo de ozônio foi produzido por um concentrador de oxigênio (marca O<sub>3</sub>R) e um gerador de ozônio (Modelo ID-10/marca O<sub>3</sub>R) e monitorado por um rotâmetro. A figura 2 mostra o esquema montado para a análise.

**Tabela 1: Condições experimentais para a realização da ozonização do efluente.**

Experimento	Concentração de norfloxacino (mg/L)	Fluxo de oxigênio que alimenta o gerador de ozônio (l/min)	pH
1	15,0	0,5	3
2	15,0	1,0	3
3	15,0	0,5	10
4	15,0	1,0	10

Os fluxos foram escolhidos em função da calibração previamente realizada na instalação do gerador de ozônio utilizando o analisador de ozônio ANSEROS Modelo GM 6000. A tabela 2 mostra a carga de ozônio gerada em função do fluxo de oxigênio escolhido, além da escolha da porcentagem de produção de ozônio na câmara reacional presente no gerador de ozônio.

**Tabela 2: Produção de ozônio em função dos fluxos de gás e da porcentagem de produção de ozônio escolhidos para a realização dos experimentos.**

Fluxo de oxigênio que alimenta o gerador de ozônio (L/min)	Porcentagem de produção de ozônio (%)	Carga de Ozônio (gO <sub>3</sub> /m <sup>3</sup> )	Produção de ozônio por unidade de tempo (g/h)	Nível do fluxo escolhido
0,5	20,0	17,5	0,52	Alto
1,0	20,0	8,8	0,26	Baixo

Para o melhor entendimento, os resultados serão discutidos em menção ao fluxo de ozônio. Assim, de acordo com a tabela 2, os níveis alto e baixo são referidos aos fluxos de ozônio na unidade g/h. Cabe ressaltar que o fluxo de ozônio aumenta quando o de oxigênio cai. Isso se deve ao fato de que mais moléculas reagem quando é menor a velocidade dentro da câmara de conversão do gerador de ozônio.

Os experimentos foram realizados em dois pH visando avaliar em qual condição a degradação do norfloxacinó é favorecida. Em pH 3 o mecanismo de degradação principal é o direto, ou seja, as insaturações das moléculas de norfloxacinó são atacadas pelo ozônio. Entretanto, em pH 10 é predominante o mecanismo indireto, onde são formados radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ).

O decaimento da concentração de norfloxacinó no meio reacional foi monitorado utilizando a curva de calibração e a medida de absorbância em espectrofotômetro. Para essa análise, o pH de todas as amostras foi ajustado para 7. A mineralização das moléculas de norfloxacinó foi monitorada a partir da análise do carbono orgânico total (COT) das amostras brutas e tratadas.

### ***Análise ecotoxicológica com *Vibrio fischeri****

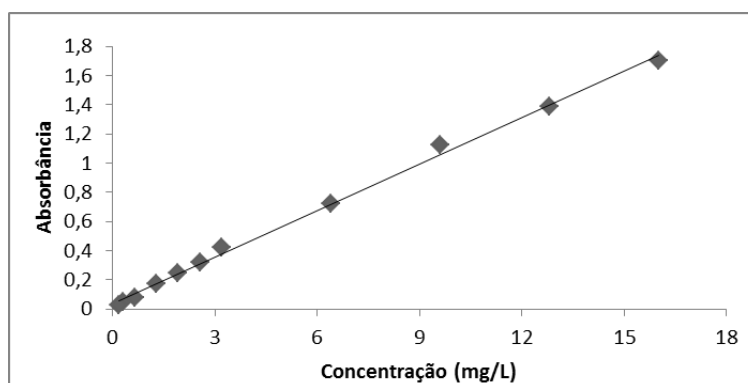
Todos os efluentes (bruto e tratados) passaram por teste ecotoxicológico com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri*, utilizando o equipamento MICROTOX<sup>®</sup> Modelo 500 Analyzer (SDI). Os testes foram realizados de acordo com as determinações da norma ABNT NBR 15411-3: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)* e seguindo o protocolo estabelecido pelo software (MICROTOX<sup>®</sup> Omni Software, versão 4.1) do próprio equipamento MICROTOX<sup>®</sup> Modelo 500 Analyzer. As bactérias liofilizadas utilizadas foram também obtidas da SDI e ficaram armazenadas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . A toxicidade aguda ( $\text{EC}_{50}$ ) foi determinada a partir de 9 (nove) diluições, em medições da luminescência da bactéria nos tempos 5, 15 e 30 minutos. Ressalta-se que, para realização dos ensaios de toxicidade, o pH das amostras foi modificado para a faixa entre 6,0 - 8,5.

## **RESULTADOS**

Abaixo são apresentados os resultados obtidos para cada uma das etapas realizadas nesse trabalho: o preparo da curva padrão, os ensaios de ozonização e a análise da toxicidade do efluente bruto e tratado.

### ***Curva de calibração de Norfloxacinó***

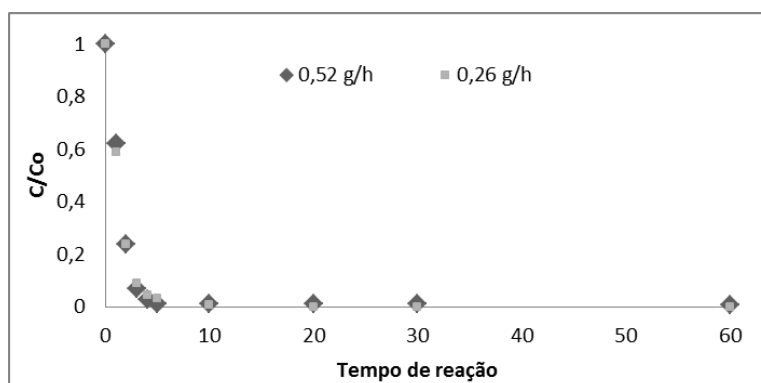
A figura 3 apresenta a curva de calibração de norfloxacinó construída em espectrofotômetro no comprimento de onda 273 nm e em pH 7. A equação da reta obtida é  $y = 0,1066 X + 0,0356$ , com coeficiente de determinação igual a 0,997, o qual demonstra uma correlação forte entre os pontos.



**Figura 3:** Curva de calibração do norfloxacinó construída em espectrofotômetro de absorção molecular.

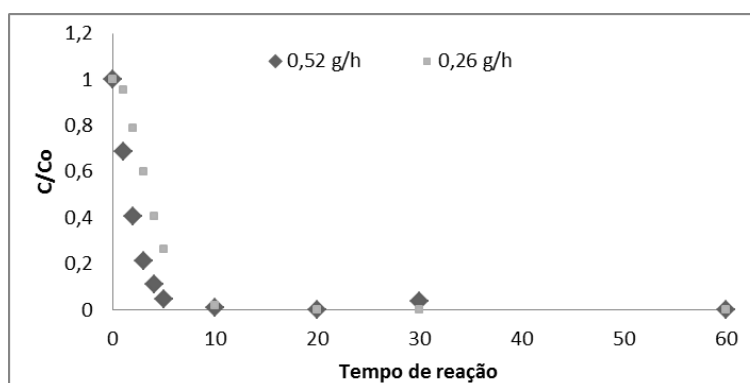
### Ozonização

Os experimentos utilizando a ozonização para o tratamento de efluente contaminado com o Norfloxacinó foram realizados com o objetivo de avaliar a sua degradação e também a mineralização. Os resultados foram agrupados de acordo com o mecanismo de degradação. Na figura 4 são apresentados os resultados para a degradação em meio ácido (mecanismo direto) e na figura 5 estão os resultados da degradação em meio básico (mecanismo indireto).



**Figura 4:** Ozonização do norfloxacinó em pH = 3.

A figura 4 ilustra que a remoção do norfloxacinó pelo mecanismo direto, utilizado para dois fluxos de ozônio, aconteceu de forma semelhante, não havendo nenhum incremento na degradação quando o fluxo de gás foi aumentado. A degradação foi rápida, atingindo quase 100% de remoção de norfloxacinó em 5 minutos de reação para os dois fluxos de ozônio aplicados.



**Figura 5:** Ozonização do norfloxacinó em pH = 10.

A figura 5 ilustra que a remoção do norfloxacinó pelo mecanismo indireto, utilizado para dois fluxos de ozônio, aconteceu também de forma semelhante, porém quando o fluxo foi aumentado a degradação aconteceu

de forma mais rápida, chegando a 98 % de remoção em 5 minutos de reação. Já para o fluxo mais baixo do gás (0,26g/h) o máximo de remoção foi alcançado apenas em 10 minutos de reação. Portanto, é possível verificar que quando o fluxo de ozônio foi dobrado o tempo da reação diminuiu pela metade. Porém, para avaliar e discutir mais adequadamente a cinética da reação, outros testes devem ser realizados.

De acordo com as figuras apresentadas, a remoção do Norfloxacino pelo ataque direto (pH ácido) das moléculas de ozônio às insaturações (figura 4) é mais rápido: em 5 minutos de reação as amostras já haviam atingido total remoção. Já o mecanismo indireto é um pouco mais lento, sendo o total de remoção apenas em 10 minutos de reação.

A tabela 3 apresenta a porcentagem de remoção de carbono orgânico total das amostras e as condições operacionais adotadas.

**Tabela 3: porcentagem de remoção de carbono orgânico total (COT) para as amostras ozonizadas.**

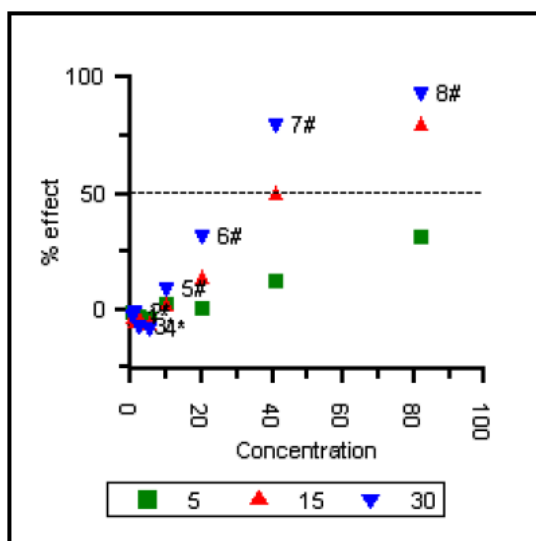
Experimento	pH	Fluxo de gás (g/h)	Remoção de COT (%)
1	3	0,52	33,2
2	3	0,26	32,5
3	10	0,52	67,7
4	10	0,26	43,8

Observa-se que a remoção de carbono orgânico total foi relativamente baixa. No mecanismo de oxidação direta, a molécula é atacada principalmente em suas insaturações, o que justifica a baixa mineralização verificada nesse processo. Esse resultado indica que a molécula de ozônio não consegue oxidar os compostos intermediários gerados na degradação do antibiótico nas condições de tempo e temperatura dos ensaios.

Com o aumento do pH, a oxidação é favorecida e a mineralização do composto aumenta. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de o potencial de redução do radical hidroxila (2,80 V) ser maior que o potencial do ozônio (2,07 V). Dessa forma, as reações de oxidação foram intensificadas pelo mecanismo indireto, ou seja, pela ação dos radicais hidroxilas. Além disso, observou-se que o aumento do fluxo de ozônio fez com que a mineralização também fosse aumentada.

#### ***Análise ecotoxicológica com *Vibrio fischeri****

A análise ecotoxicológica realizada com o efluentes bruto mostra que o Norfloxacino a 15 mg/L é tóxico, com o EC50 de 26,25% em 30 (trinta) minutos (Figura 6).



**Figura 6: Porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de Norfloxacino nos tempos 5, 15 e 30 minutos.**

A análise de toxicidade com os efluentes tratados esclarece que os mecanismos de oxidação direta promovem um aumento da toxicidade da amostra, já o processo por oxidação indireta não apenas reduz a toxicidade como é capaz de elimina-la no fluxo mais elevado de ozônio, ou seja, no experimento 3 (Tabela 4).

**Tabela 2: Resultados de toxicidade (EC50) de efluentes provenientes de tratamento por ozonização**

Tratamento por ozonização	
Amostra	Toxicidade
Norfloxacino bruto	EC50 (30min) = 26,25%
Experimento 1	EC50 (30min) = 4,35%
Experimento 2	EC50 (30min) = 7,53%
Experimento 3	<i>Hormesis</i>
Experimento 4	EC50 (30min) = 65,96%

Os resultados dos testes ecotoxicológicos sugerem que a oxidação por ozônio, embora seja capaz de degradar rapidamente o Norfloxacino (Figura 4), acaba por gerar metabólitos ainda mais tóxicos. Chega-se a essa conclusão a partir da detecção de que, embora o antibiótico deixe de existir, a amostra apresenta-se ainda mais tóxica que a bruta. Observa-se, ainda, que quando o fluxo de ozônio aplicado é maior (experimento 1) a amostra fica ainda mais tóxica, sugerindo que essa condição favorece o aparecimento de subprodutos tóxicos (Figura 7).

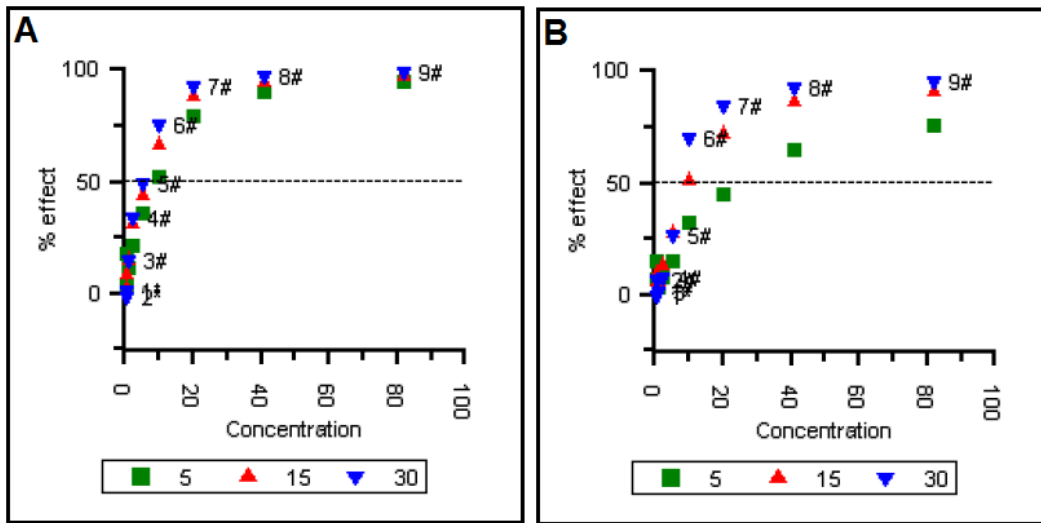


Figura 7: No gráfico A, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos no experimento 1. No gráfico B, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos no experimento 2.

Já com relação à oxidação indireta, através do radical hidroxila, observa-se uma melhoria do efluente do ponto de vista ecotoxicológico. Embora a degradação do Norfloxacin seja mais lenta nessas condições (Figura 5), nota-se que nesse caso a mineralização do antibiótico ocorre de maneira mais efetiva, isso é, gerando nenhum ou menos subprodutos tóxicos. Os resultados de toxicidade esclarecem que o processo foi capaz de reduzir a toxicidade do efluente e, no caso do fluxo mais elevado de ozônio (experimento 3), a amostra deixou de ser tóxica (Figura 8). Esclarece-se que no experimento 3 foi detectada *hormesis*, isso é, um desvio positivo apresentado pelo organismo-teste na presença do contaminante. Ressalta-se que a detecção da *hormesis* não é sinal de que o contaminante seja benéfico ao organismo, ao contrário, pode tratar-se de contaminante que se apresenta tóxico em testes de toxicidade crônica.

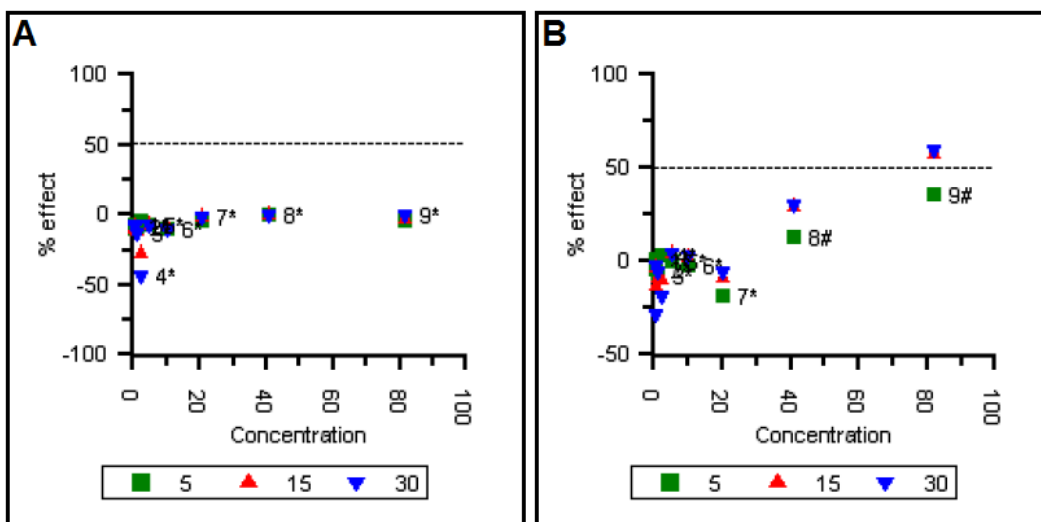


Figura 8: No gráfico A, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos no experimento 3. No gráfico B, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos no experimento 4.

Salienta-se que o estudo ainda está em andamento. Destarte, análises continuam sendo realizadas para confirmar os resultados. Acontecerão, ainda, novas análises que buscarão detectar a formação e identificar a natureza dos metabólitos gerados durante o processo de degradação do Norfloxacin.

## CONCLUSÕES

A partir do trabalho desenvolvido é possível verificar que o Norfloxacin é facilmente monitorado por espectrofotometria de absorção molecular. Além disso, observa-se que a ozonização é eficiente e rápida para a remoção do antibiótico de efluentes aquosos. Entretanto, compostos intermediários são gerados e a completa mineralização não é atingida. Os mecanismos indiretos de oxidação mostraram-se mais eficientes, embora mais lentos que os de oxidação direta. Com relação à ecotoxicidade, a oxidação indireta reduz a toxicidade da amostra, enquanto a direta aumenta.

No contexto ecológico, os fármacos diluídos em corpos d'água apresentam elevado poder de ocasionar distúrbios negativos, alterando o desempenho de vários organismos no meio ambiente. Apesar disso, no Brasil, estudos sobre a redução da toxicidade em efluentes contaminados são incipientes e pouca informação está disponível. É necessário desenvolver o conhecimento a respeito da eliminação dos fármacos por técnicas de tratamento de água. Mesmo se mostrando eficientes e importantes, os POA ainda não são amplamente explorados em escala industrial devido ao desconhecimento dos reais custos a serem aplicados. Estes custos podem ser ainda mais baixos que o tratamento convencional se o POA for bem empregado. Esse contexto reforça a necessidade de pesquisas aplicadas aos tratamentos mais avançados, buscando torná-los mais eficientes (inclusive financeiramente).

## AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem as agências de fomento que apoiaram financeiramente este trabalho: FAPEMIG, CAPES e CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSALIN, R.; DURÁN, N.. Novas tendências para aplicação de ozônio no tratamento de resíduos: ozonização catalítica. *Analytica*. 2006.
2. COELHO, A. D.. Degradação dos Antiinflamatórios Diclofenaco, Ibuprofeno e Naproxeno por Ozonização. Tese de Doutorado. UFJR/COOPE. Rio de Janeiro, 2008.
3. FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, 2006.
4. KRAUSE, L. G. T. Degradação do antibiótico sulfametoxazol por ozonização e Avaliação da atividade antimicrobiana. 92f. Tese (Doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.
5. LARRSON, D. G. J.; PEDRO C.; PAXEUS N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, v.148, p. 751-755, 2007.
6. MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* v.13, n.3, p.355-381, 2008.
7. MAHMOUD, A.; FREIRE, R. S.. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. *Química Nova*. 2007.
8. TERNES, T.A.. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, v. 32, n. 11, p. 3245–3260. 1998.