IV-031 – ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA COM *Vibrio fischeri* DE EFLUENTES BRUTOS E TRATADOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE GENTAMICINA E NORFLOXACINO

Raquel Sampaio Jacob[(1)]
Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Especialista em Saneamento e Meio Ambiente pela Universidade Federal de Minas Gerais. Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais.
Lucilaine Valéria de Souza Santos[(2)]
Graduação em Química pela Universidade Federal de Minas Gerais. Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais. Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais.
Liséte Celina Lange[(3)]
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[(1)]**:** Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha - Belo Horizonte – Minas Gerais - CEP: 31270-901- Brasil - Tel: (31) 3409-5000 - e-mail: sampaiojacob@gmail.com

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 humana e veterinária 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 desses relacionados à contaminação por fármacos. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar uma série de análises ecotoxicológicas com *Vibrio fischeri* de efluentes brutos e tratados (tratamento biológico) contaminados com os antibióticos Sulfato de Gentamicina ou Norfloxacino. Para tal, foram montados reatores para simulação de tratamento biológico utilizando biomassas provenientes do processo de Lodos Ativados, UASB e Biodigestor Anaeróbio. Os reatores foram montados com lodo aclimatado ou não aclimatado e com Norfloxacino (15mg/L) ou Sulfato de Gentamicina (100 mg/L). Os efluentes brutos e os provenientes dos reatores foram submetidos a teste ecotoxicológico com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. As análises de toxicidade dos fármacos em seu estado bruto esclarecem que apenas o Norfloxacino é tóxico, já que o Sulfato de Gentamicina proporciona o fenômeno de *hormesis*. Os resultados demonstram que dentre os tipos testados de tratamento biológico, o mais eficiente é o que utiliza biomassa proveniente de reator UASB, seguido do Biodigestor Anaeróbio e, por último, Lodos Ativados. Porém, verificou-se nas três situações que a matéria orgânica biodegradável (glicose) é preferencialmente consumida em relação aos antibióticos. Ainda assim, pode-se dizer que o tratamento biológico através de reator UASB e Biodigestor Anaeróbio são suficientes para eliminar a toxicidade dos antibióticos, ainda que não proporcionem taxas expressivas de degradação dos fármacos. No entanto, com relação ao processo de Lodos Ativados, todos os efluentes gerados são tóxicos, sobretudo os provenientes de reatores com biomassa aclimatada. Dentre todos os reatores testados, os efluentes mais tóxicos são os advindos dos reatores de Lodos Ativados e contaminados com Norfloxacino - mesmo que essa contaminação tenha ocorrido apenas durante o processo de aclimatação.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia, *Vibrio fischeri*, Tratamento Biológico, Norfloxacino, Sulfato de gentamicina.

INTRODUÇÃO

Uma grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Estes compostos farmacêuticos incluem antiinflamatórios, antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, antidepressivos, agentes quimioterápicos, contraceptivos e outros mais. De acordo com Gebhardt e Schröder (2007), essas substâncias químicas, uma vez dispostas ou excretadas por residências, hospitais ou indústrias, tanto em sua forma original quanto em forma de metabólitos, muitas vezes permanecem estáveis

após tratamentos convencionais ou mesmo avançados. Os antibióticos constituem um caso especial, isso porque, correspondem à maior categoria de fármacos utilizados na medicina humana e veterinária e podem promover a resistência bacteriana de microorganismos em corpos d'água (KRAUSE, 2009).

A ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos, como fármacos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Seus instrumentos de análise são capazes de responder preditivamente à toxicidade de substâncias químicas, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos, além de levarem em consideração o sinergismo ou antagonismo de substâncias químicas. No Brasil, a regulamentação dessas análises acontece através da Resolução CONAMA 357/05 e Resolução CONAMA 430/11.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar uma série de análises ecotoxicológicas com *Vibrio fischeri* de efluentes brutos e tratados (tratamento biológico) contaminados com Sulfato de Gentamicina ou Norfloxacino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para desenvolvimento do trabalho procedeu-se, inicialmente, com a preparação de efluentes sintéticos, um com a concentração de 15 mg/L de Norfloxacino e outro com a concentração de 100 mg/L de Sulfato de Gentamicina. Esses efluentes foram, então, submetidos ao tratamento biológico (Lodos Ativados, reator UASB e Biodigestor Anaeróbio) – antes e após aclimatação do lodo. Após haver realizado o processo de tratamento pelos métodos supracitados, realizou-se a análise ecotoxicológica com a bactéria *Vibrio fischeri* das amostras brutas e tratadas. Insta ressaltar que o monitoramento da concentração do Norfloxacino foi realizado através do Analisador de Carbono Orgânico Total (COT), marca Shimadzu, modelo TOC-V_{CPN}, com amostrador automático ASI-V e UV/VIS Perkin Elmer Lambda XL. O Sulfato de Gentamicina somente foi monitorado através da concentração COT, devido à escassez de grupo cromóforos na molécula deste aminoglicosídeo.

Tratamento Biológico

A biomassa utilizada para a montagem dos reatores foi coletada na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas, localizada na região de Sabará (Minas Gerais). Foram coletados lodos do processo de tratamento com Lodos Ativados, reatores UASB e Biodigestor Anaeróbio.

Para a aclimatação da biomassa, advinda dos três processos de tratamento já mencionados, foram montados reatores de aproximadamente 2L, que receberam por 9 (nove) semanas carga crescente de cada antibiótico em estudo e decrescente de solução de glicose e nutrientes.

Os reatores biológicos anaeróbios foram montados de acordo com metodologia proposta por FIEL *et al* (1988). Em cada reator foi adicionado 200 mL de solução de nutrientes (Tabela 1), lodo anaeróbio aclimatado ou não aclimatado e solução contendo o antibiótico em estudo. Já os reatores aeróbios, foram montados a partir de uma adaptação da metodologia proposta por Zahn Wellens (OECD, 1995). Em cada reator aeróbio foram adicionados 1,5 mL de solução de nutrientes ($CaCl_2$, $FeCl_3.7H_2O$, $MgSO_4$ e tampão fosfato), lodo aeróbio aclimatado ou não aclimatado e solução contendo o antibiótico em estudo.

Tabela 1: Composição das soluções de nutrientes para os reatores anaeróbios

Solução de Macronutrientes (L)		Solução de Micronutrientes (L)	
Reagentes	Quantidade (g)	Reagentes	Quantidade (g)
KH_2PO_4	1,5	$FeCl_3.H_2O$	2,00
K_2HPO_4	6,5	$ZnCl_2$	0,05
NH_4Cl	5,0	$CuCl_2.2H_2O$	0,03
$Na_2S.9H_2O$	0,5	$MnCl_2.4H_2O$	0,50
$CaCl_2.2H_2O$	1,0	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0,05
$MgCl_2.6H_2O$	1,0	$NiCl_2.6H_2O$	0,05
		$AlCl_3$	0,05
		$CaCl_2.6H_2O$	2,00
		H_3BO_4	0,01
		HCl	1 mL

Análise ecotoxicológica com Vibrio fischeri

Todos os efluentes (brutos e tratados) passaram por teste ecotoxicológico com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri*, utilizando o equipamento MICROTOX® 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® Omni Software, versão 4.1) do próprio equipamento MICROTOX® Modelo 500 Analyzer. As bactérias liofilizadas utilizadas foram também obtidas da SDI e ficaram armazenadas à temperatura de – 20ºC. A toxicidade aguda (EC_{50}) foi determinada a partir de 9 (nove) diluições, em medições da luminescência da bactéria nos tempos 5, 15 e 30 minutos.

RESULTADOS

Tratamento Biológico

A seguir, são apresentados os resultados obtidos durante o processo de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia, com e sem aclimatação da biomassa, para o antibiótico Norfloxacino. Na figura 1 esses resultados são expressos em função do Carbono Orgânico Total (COT), já na figura 2 esses resultados apresentam-se de forma mais específica, isso é, em termos de UV/VIS.

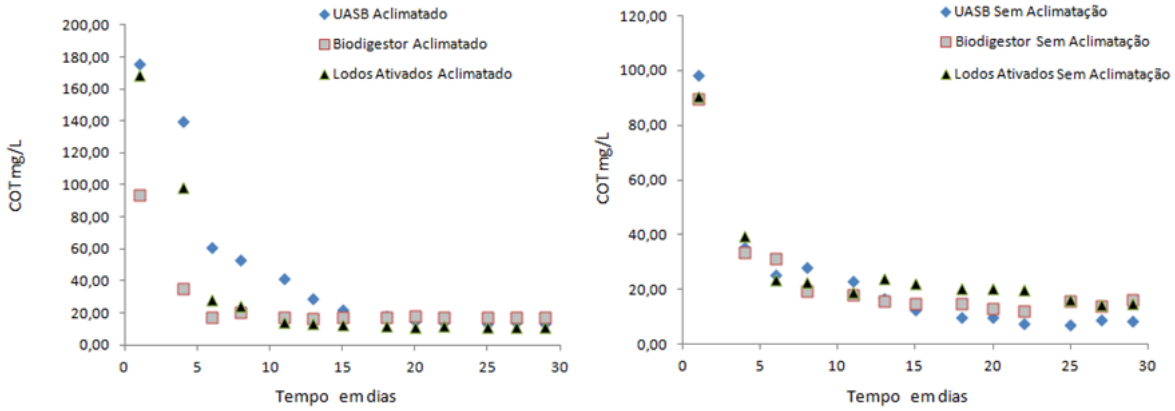

Figura 1: Monitoramento por COT da biodegradabilidade dos reatores contendo Norfloxacino utilizando biomassa aclimatada e sem aclimatação.

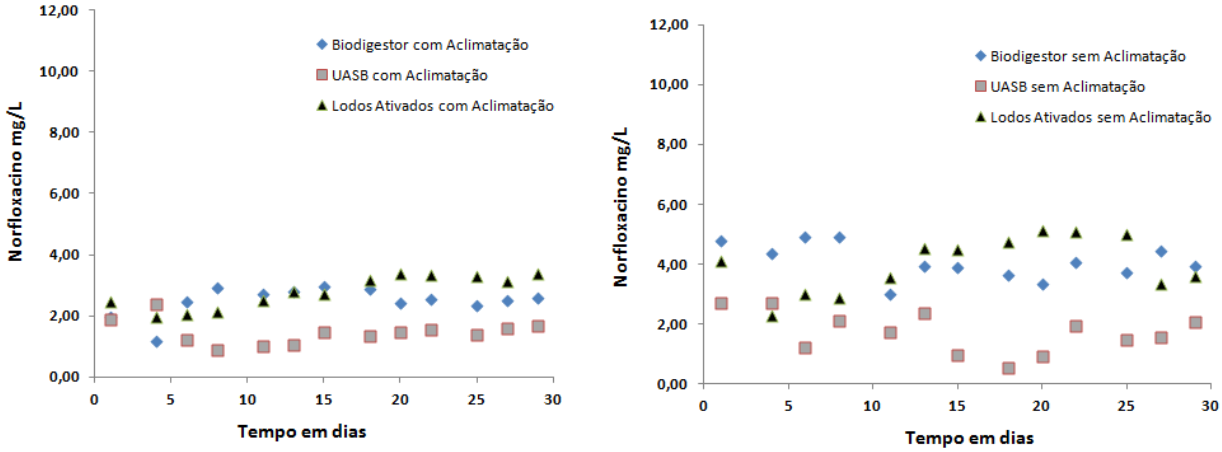

Figura 2: Monitoramento por UV/VIS da biodegradabilidade dos reatores contendo Norfloxacino utilizando biomassa aclimatada e sem aclimatação.

Observa-se uma eficiência de remoção de aproximadamente 90% de Carbono Orgânico Total, mas quando se avalia a remoção do composto alvo de maneira específica, observa-se uma redução em torno de 20%. Isso significa dizer que a redução significativa de matéria orgânica está relacionada à presença de glicose que é facilmente biodegradada, não à degradação do antibiótico.

Segundo Fernicola e Oliveira (2002) uma mistura complexa de microrganismos pode se adaptar à presença de determinados xenobióticos e aumentar a eficiência do processo de degradação. Contudo, neste caso, observou-se um aumento muito discreto na eficiência da remoção do antibiótico norfloxacino após aclimatação da biomassa (Figura 3).

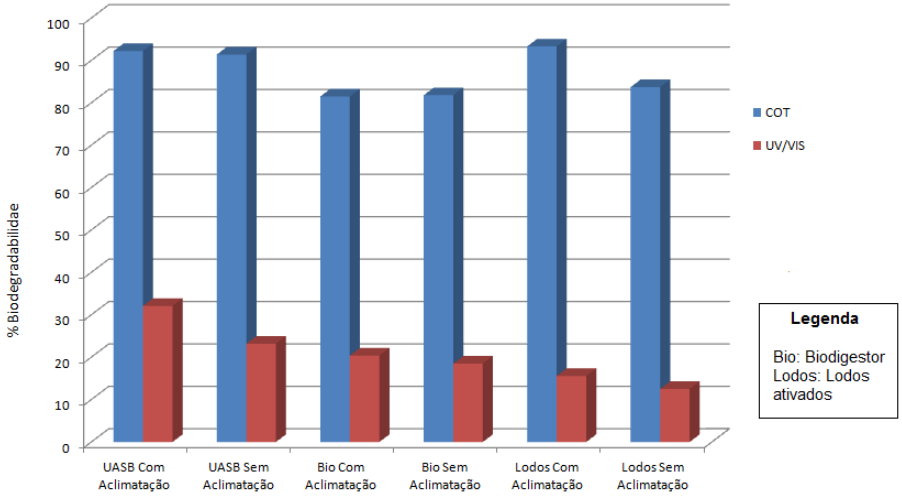

Figura 3: Eficiência da biodegradabilidade do Norfloxacino, em termos de COT e UV/VIS, utilizando biomassa aclimatada e sem aclimatação.

Com relação aos reatores contendo Sulfato de Gentamicina, observa-se padrão semelhando ao observado com o Norfloxacino (Figura 4). Isso é, elevada remoção de matéria orgânica em termos de Carbono Orgânico Total. Contudo, não se pode afirmar que a taxa de remoção do antibiótico foi também elevada, uma vez que não é possível monitorar o Sulfato de Gentamicina de maneira específica.

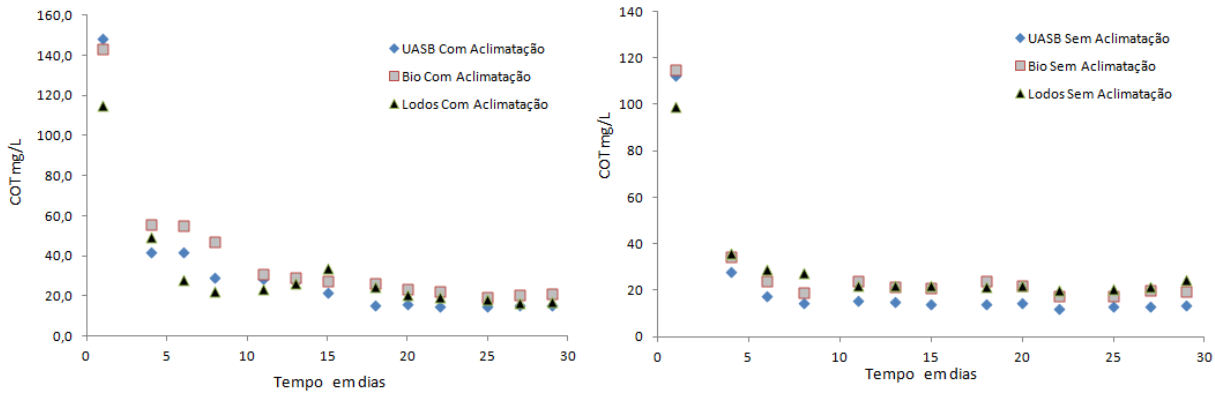

Figura 4: Monitoramento por COT da biodegradabilidade dos reatores contendo Sulfato de Gentamicina utilizando biomassa aclimatada e sem aclimatação.

Insta ressaltar que, em termos de eficiência de biodegradabilidade, o lodo proveniente do reator UASB mostra-se mais eficiente que o proveniente do Biodigestor Anaeróbio, que é ainda mais eficiente que o advindo dos Lados Ativados, tanto para o Norfloxacino quanto para o Sulfato de Gentamicina.

Análise ecotoxicológica

As análises ecotoxicológicas realizadas com os efluentes brutos mostraram que o Norfloxacino a 15 mg/L é tóxico, com o EC_{50} de 26,25% em 30 (trinta) minutos (Figura 5). Já o Sulfato de Gentamicina a 100 mg/L não apresenta toxicidade no teste em 30 (trinta) minutos (Figura 5). Para o Sulfato de Gentaminina 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.

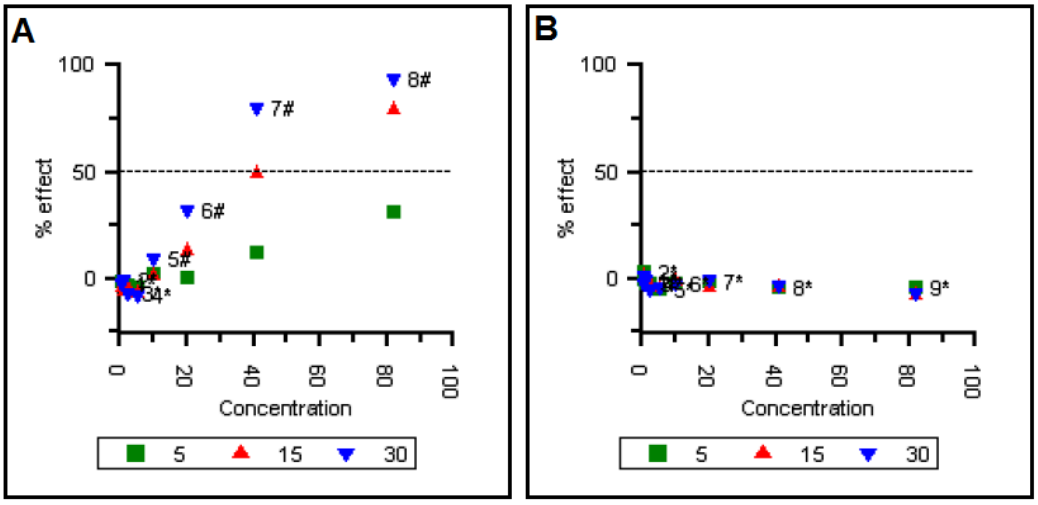

Figura 5: No gráfico A, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de Norfloxacino nos tempos 5, 15 e 30 minutos. No gráfico B, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de Sulfato de Gentamicina nos tempos 5, 15 e 30 minutos.

Nos testes realizados com os efluentes provenientes dos reatores UASB – tanto com bactérias aclimatadas quanto com bactérias não aclimatadas – não foi detectada toxicidade. Em todos os testes, incluindo/ o proveniente do grupo controle (glicose), foi detectada a *hormesis*. Essa detecção provavelmente justifica-se pelo fato de ser o UASB o método mais eficaz para a remoção dos antibióticos estudados.

Já nos testes realizados com efluentes provenientes dos Biodigestores anaeróbios, houve indício de toxicidade nos reatores onde foram acrescentados Norfloxacino. Isso é, os efluentes não estavam tóxicos (EC_{50}>81,9%), mas houve efeito de inibição de luz sob as bactérias. Nesse caso, os resultados são expressos em "maior porcentagem de efeito", o que significa maior efeito de inibição de luz detectada. No reator com Norfloxacino e

lodo sem aclimatação, o maior efeito de inibição de luz observada foi de 12, 99% em 30 (trinta) minutos (Figura 6). Já nos reatores com norfloxacino e lodo aclimatado, esse efeito foi de 7,88% em 30 (trinta) minutos (Figura 6), portanto menor que o observado na presença de bactérias não aclimatadas (que são, de fato, menos eficientes). Para todos os demais reatores detectou-se *hormesis*.

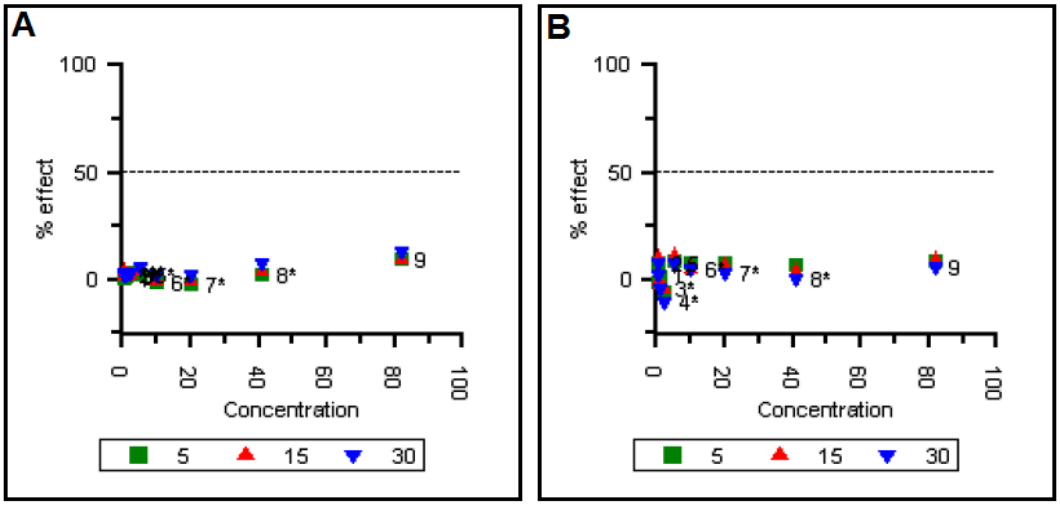

Figura 6: No gráfico A, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos em biodigestor com lodo não aclimatado. No gráfico B, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos em biodigestor com lodo aclimatado.

É importante esclarecer que amostras cujo resultado de toxicidade é expresso em "maior porcentagem de efeito" geralmente são tóxicas em testes de toxicidade aguda mais longos ou, ainda, em testes de toxicidade crônica.

Por último, os efluentes provenientes de reatores com tratamento por Lodos Ativados foram os mais tóxicos dentre todos os avaliados, evento que pode ser justificado pela menor eficiência desse tipo de tratamento em comparação aos demais. Os resultados de toxicidade dos efluentes supracitados (Tabela 2) elucidam que aqueles derivados dos reatores com biomassa aclimatada apresentam toxicidade mais elevada que dos com biomassa não aclimatada. Esse fato parece contradizer os resultados obtidos pela avaliação do tratamento biológico, que apontam a aclimatação como responsável por discreta melhoria na capacidade de biodegradabilidade das bactérias. Entretanto, pode-se supor que essa situação deve-se a formação de metabólitos tóxicos: provavelmente as bactérias aclimatadas estão, em verdade, degradando mais eficientemente os fármacos, porém gerando metabólitos mais tóxicos em função dessa decomposição.

Tabela 2: Resultados de toxicidade (EC_{50}) de efluentes provenientes de tratamento por Lodos Ativados (aclimatados e não aclimatados)

Tratamento por Lodos Ativados		
Reator		EC50 (30 min)
Não aclimatados	Controle	58,83%
	Norfloxacino	25,94%
	Gentamicina	32%
Aclimatados	Controle (lodo Norfloxacino)	1,31%
	Norfloxacino	2,14%
	Controle (lodo Gentamicina)	8,55%
	Gentamicina	3,58%

É importante salientar que mesmo o efluente proveniente do reator controle (glicose) de Lodos Ativados é tóxico ($EC_{50\ (30\ min)}$ 58,83%), embora menos que os demais. Isso sugere que a biomassa, por si só, proporciona toxicidade ao efluente.

Observa-se, ainda, que os efluentes contaminados com Norfloxacino e tratados por Lodos Ativados são ainda mais tóxicos que os contaminados com o Sulfato de Gentamicina nas mesmas circunstâncias. Resultado semelhante foi também observado através da medição de toxicidade dos efluentes brutos (Figura 5), onde o Norfloxacino apresentou toxicidade e o Sulfato de Gentamicina proporcionou *hormesis*. Levando-se esse fato em consideração, a toxicidade mais elevada dos efluentes contaminados com Gentamicina em comparação ao controle (glicose), sugere a formação de metabólitos tóxicos no processo de degradação do antibiótico. Outra hipótese seria uma possível relação sinérgica, em termos de toxicidade, entre a biomassa de Lodos Ativados e o Sulfato de Gentamicina. Caso nenhuma das duas hipóteses fossem verdadeiras, não haveria adição de toxicidade pela presença do Sulfato de Gentamicina, já que o antibiótico bruto apenas proporciona *hormesis*.

Conforme já mencionado, os efluentes mais tóxicos dentre todos os testados são, portanto, os provenientes dos reatores de Lodos Ativados e contaminados com Norfloxacino – mesmo que essa contaminação tenha ocorrido apenas durante o processo de aclimatação (Figura 7).

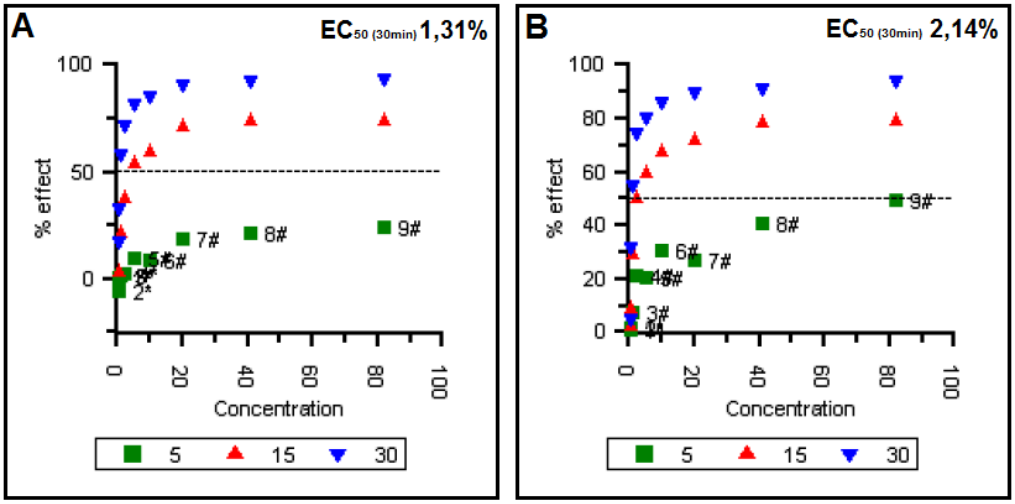

Figura 7: No gráfico A, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos em reator controle de Lodos Ativados com biomassa aclimatada com Norfloxacino. No gráfico B, porcentagem de efeito (redução de luminosidade) em função da concentração de efluente nos tempos de 5, 15 e 30 minutos em reator de Lodos Ativados contaminado com Norfloxacino e utilizando biomassa aclimatada.

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

CONCLUSÕES

Dentre os tipos testados de tratamento biológico, o mais eficiente é o que utiliza biomassa proveniente de reator UASB, seguido do Biodigestor Anaeróbio e, por último, Lodos Ativados. Porém, verificou-se nas três situações, que a matéria orgânica biodegradável (glicose) é preferencialmente consumida em relação aos antibióticos. Exemplo disso é o fato de que, embora 90% da glicose tenha sido degradada, apenas 20% do Norfloxacino foi decomposto. Essa situação suscita a investigação de novas alternativas de tratamento. Com relação à aclimatação da biomassa, ela foi exitosa no objetivo de melhorar as taxas de degradabilidade dos antibióticos, porém de forma muito discreta.

Quanto aos testes ecotoxicológicos, pode-se dizer que o tratamento biológico através de reator UASB e Biodigestor Anaeróbio são suficientes para eliminar a toxicidade dos antibióticos, ainda que não proporcionem taxas expressivas de degradação dos fármacos. No entanto, com relação ao processo de Lodos Ativados, todos os efluentes gerados são tóxicos, sobretudo os provenientes de reatores com biomassa aclimatada. Essa questão aponta para possível geração de metabolitos tóxicos durante o processo de degradação dos antibióticos estudados, bem como para a possibilidade de a própria biomassa de Lodos Ativados atribuir toxicidade ao efluente.

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. O monitoramento da contaminação do meio ambiente por medicamentos é, portanto, aconselhável. Nesse sentido, os resultados dos estudos ecotoxicológicos são de grande auxílio. Eles podem ser empregados como instrumentos de vigilância, podendo ser utilizados como marcadores cientificamente aprovados das alterações ambientais significativas.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT. NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente). Rio de Janeiro, 2006.
2. BRASIL. CONAMA. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente, Brasilia, DF, 17 de março de 2005, edição n.53, seção 1, p.58-63.
3. BRASIL. CONAMA. Resolução 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 13 de maio de 2011.
4. FERNICOLA, N.A.G.G. e OLIVEIRA, S. Poluentes Orgânicos Persistentes: POPS**.** Série Cadernos de Referência Ambiental. Salvador, 13, 2000.
5. FIELD, J.; SIERRA, R.; LETTING, G. Ensayos anaerobios. 4º Seminario de depuración de aguas residuales Spain: Valladolid, 1988.
6. GEBHARDT W.; SCHRÖDER H.F. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. J. Chromatogr. A, v.1160, p.34-43, 2007.
7. KRAUSE, L. G. T. Degradação do antibiótico sulfametoxazol por ozonização e Avaliação da atividade atimicrobiana. 92f. Tese (Doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.
8. 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.
9. MINAS GERAIS. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário do Executivo, Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, MG, 05 de Maio de 2005.
10. OECD. Detailed review paper on biodegradability testing environment monograph. N° 98, 1995.