

II-023 - ESTUDO DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA: AVALIAÇÃO DE SUBPRODUTOS E TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Raquel Vieira Busto⁽¹⁾

Bacharel em Química e Engenharia Ambiental e Urbana pela Universidade Federal do ABC (UFABC). Doutora em Ciência e Tecnologia/ Química pela UFABC. Pesquisadora Doutora Colaboradora na UFABC.

Lúcia Helena Gomes Coelho⁽¹⁾

Bacharel e Licenciada em Química pela Universidade de São Paulo (USP). Mestre e Doutora em Química Analítica pela USP. Professora Adjunta IV do Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais da UFABC.

Endereço⁽¹⁾: Av. dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha, Santo André - SP - CEP: 09210-580 - Brasil - Tel: (11) 4996-7496- e-mail: raquel.busto@aluno.ufabc.edu.br

RESUMO

No Brasil, estudos de avaliação e monitoramento de micropoluentes em matrizes ambientais, como esgotos sanitários, ainda são bastante incipientes, assim como as tecnologias para a remoção desses compostos em Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Considerando-se o aumento na produção e consumo de produtos que contém este tipo de compostos (itens de higiene pessoal, medicamentos, dentre outros), faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que sirvam como subsídio para a elaboração de leis e regulamentos que permitam o uso ambientalmente seguro de lodos e efluentes. O presente trabalho estudou a degradação do antibiótico amoxicilina em três diferentes concentrações (2500, 25000 e 250000 $\mu\text{g L}^{-1}$) empregando efluente sintético para simular as condições de um efluente primário e utilizando seringas de vidro de 100 mL que serviram como reator anaeróbico para os experimentos. Durante o teste de degradabilidade, apenas a concentração de 250000 $\mu\text{g L}^{-1}$ causou inibição na produção de biogás do sistema, a qual ocorreu apenas nos primeiros 16 dias de experimento; ao final do experimento (28 dias), todos os sistemas, incluindo o branco (ausência de amoxicilina), apresentaram taxas de degradação equivalentes. A análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas mostrou a presença de quatro compostos com a transição $366,11 \rightarrow 160,0428$, além dos compostos ácido penicilínico de amoxicilina, amoxicilina diketopiperazina e ácido amoxicilínico I. A concentração dos compostos identificados foi estimada com base na curva de calibração para amoxicilina, e os resultados obtidos foram comparados com os resultados dos ensaios de ecotoxicidade empregando a alga *Raphidocelis subcapitata*, a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* e o teste empregando o método de Germinação de Sementes e Crescimento Radicular para sementes de alface (*Lactuca sativa*). Os resultados indicaram que elevadas concentrações de subprodutos ao final do experimento estimulam tanto o crescimento das sementes de alface quanto a atividade luminescente da bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, muito embora não tenha se observado efeito sobre a alga *Raphidocelis subcapitata*.

PALAVRAS-CHAVE: Biodegradação, amoxicilina, ecotoxicidade.

INTRODUÇÃO

O estilo de vida das populações urbanas, caracterizado pelo alto consumo de medicamentos (p. ex: analgésicos; antibióticos; reguladores lipídicos; anti-inflamatórios; hormônios sintéticos), produtos de higiene pessoal, surfactantes, entre outros, faz do esgoto doméstico uma das principais vias de entrada de inúmeros contaminantes no ambiente. Como características principais desses poluentes destacam-se a sua persistência no ambiente e não biodegradabilidade (poluentes refratários). Recentemente, esses compostos têm sido objeto de muitos estudos de monitoramento, tendo sido detectados em águas tratadas, efluentes, sedimentos, águas superficiais e até subterrâneas, o que indica a baixa eficiência de remoção destes compostos pelos sistemas de tratamento de efluentes convencionais (FERNANDEZ et al., 2007; SALGADO et al., 2010; OOSTERHUIS et al., 2013; LÓPES-DOVAL et al., 2017). Estes entram no ciclo da água como compostos parentais e seus metabólitos, quando parcialmente metabolizados e excretados pelo organismo. Além disso, estes compostos podem ser liberados no meio ambiente através de efluentes não tratados despejados diretamente em cursos

d'água ou que não são removidos completamente durante o tratamento de esgotos convencional, sendo, por muitas vezes, despejados em águas superficiais.

Uma das classes de micropoluentes, os antibióticos, tem recebido atenção especial, uma vez que eles podem causar distúrbios relacionados às funções da microbiota em ETEs, como por exemplo, o risco de desenvolvimento de microrganismos resistentes (VAN ELSAS et al., 2007). Torna-se, assim, imprescindíveis estudos relacionados à eficiência e rotas de degradação de micropoluentes, além de avaliação dos subprodutos de degradação de poluentes orgânicos em efluentes e lodos provenientes de ETEs. Mais especificamente, a condução de estudos que dizem respeito aos micropoluentes, os quais surgem em função do estilo de vida de cada população, e que ainda não tem os efeitos sob a saúde humana e de outros organismos vivos bem estabelecidos.

No Brasil, os principais sistemas de tratamento de esgotos domésticos a nível secundário envolvem o uso de lagoas de estabilização, lodos ativados, sistemas aeróbios com biofilmes e sistemas anaeróbios, a exemplo dos reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB). No entanto, tem sido comum o uso de reatores anaeróbios como tratamento primário devido à suas diversas características e vantagens. Além de reduzir o tamanho total da planta de tratamento de efluentes e, portanto, reduzir as necessidades energéticas e custos de uma operação que emprega lodos ativados, por exemplo, os reatores anaeróbios por si só requerem baixo consumo de energia elétrica, geram baixos volumes de lodo (sendo esse mais estabilizado), reduzem a necessidade de equipamentos para operação e produtos químicos para desidratação. Além de requererem baixas áreas construtivas (podendo inclusive ser enterrados) e poderem ser implantados em pequenas comunidades, o biogás derivado do processo pode ainda ser utilizado como fonte para cogeração de energia (CHERNICHARO, 2007). É preciso levar em consideração, porém, que a presença de produtos farmacêuticos e outros micropoluentes podem afetar a eficiência energética do processo, reduzindo a produção de biogás e modificando sua composição química.

Assim, esse trabalho teve por objetivo determinar a biodegradabilidade do antibiótico amoxicilina, sob condições anaeróbias, por um método simples empregando-se seringas de vidro, avaliando-se a formação de subprodutos e ecotoxicidade do efluente tratado.

METODOLOGIA

Preparo de Efluente Sintético

O efluente sintético, baseado no trabalho de Souza (2011), foi composto por frações orgânicas de fácil e difícil degradação, assim como compostos que proporcionam maior complexidade ao sistema, como celulose, óleo de cozinha e detergente; também foram adicionados sais, como cloreto e bicarbonato de sódio, e micronutrientes, como cloreto férrico e cúprico (Tabela 1). O mesmo foi utilizado para simular os parâmetros físico-químicos comumente encontrados em sistemas de tratamento primário.

Tabela 1: Composição típica do efluente sintético a ser utilizado no presente estudo.

Classificação do composto	Composição	Concentração (mgL ⁻¹)
Carboidratos (40% DQO)	Sacarose	56
	Celulose	54,4
Proteínas (50% DQO)	Extrato de carne	332,8
Lipídeos (10% DQO)	Óleo de soja	81,6
Para emulsionar o óleo	Detergente	(5 gotas L ⁻¹)
Tampão	NaHCO ₃	320
	NaCl	250
	MgCl ₂ .6H ₂ O	7
	CaCl ₂ .2H ₂ O	4,5
	NH ₄ Cl	153,0
	KH ₂ PO ₄	36
	EDTA	30
	FeCl ₃ .6H ₂ O	4,5
	H ₃ BO ₃	0,45
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,09
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,18
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,36
	KI	0,54
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,45
Sais e micronutrientes		

Avaliação da Biodegradabilidade dos Compostos Estudados (Teste da Seringa)

O sistema consistiu em seringas de 100 mL de vidro às quais foram adicionados o efluente contendo os compostos de interesse (efluente sintético) e o lodo digerido (inóculo). Cada seringa foi preenchida com uma razão final mmol carbono orgânico/ g sólidos voláteis igual a 0,2, em um volume final de 33 mL. Para tanto, o efluente sintético foi preparado concentrado em 10 vezes a receita original, gerando uma Demanda Química de Oxigênio de 9200 mg O₂ L⁻¹. Foram escolhidas três concentrações para estudo do efeito da amoxicilina sobre a biodegradabilidade anaeróbia do sistema, a saber: 250, 2500 e 25000 µg L⁻¹; para o experimento, assim como observado para o efluente sintético, utilizou-se uma concentração 10 vezes maior. Ao final, nitrogênio foi borbulhado à mistura para obtenção de condições anaeróbias e a seringa, selada com o êmbolo e levada a uma incubadora a 35 °C sob as condições estipuladas. O biogás gerado no processo foi medido através da movimentação do êmbolo, sendo o volume correspondente à taxa de biodegradação de amoxicilina (ISO 11734:1995).

Análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LCMS)

Foi empregado um equipamento Q Exactive (Thermo Fischer) e coluna Accucore C₁₈ LC (100 x 2,1 mm) (Thermoscientific). A fase móvel, operando com fluxo de 0,2 mL min⁻¹, foi composta de metanol (eluente A) e 0,1 % de ácido fórmico em água (eluente B), conforme indica o gradiente apresentado na Tabela 2:

Tabela 2: Gradiente multifásico utilizado durante a análise de amoxicilina e seus subprodutos por LCMS.

Tempo	Fase A	Fase B
0-1 min	1 %	99 %
1-13 min	1 – 70 %	99 – 30 %
13-14 min	70 – 99 %	30 – 1 %
14-20 min	99 %	1 %
20-21 min	99 – 1 %	1 – 99 %
21-30 min	1 %	99 %

Análises Ecotoxicológicas

Em todas as análises ecotoxicológicas, as amostras foram filtradas com filtro 1,7 µm e diluídas 1:10 (v/v) com água deionizada.

Alga *Raphidocelis subcapta*: Os testes foram conduzidos de acordo com a OECD, Teste número 201 (OECD, 2011). Três dias antes do início do teste, a cultura contendo cerca de 10^7 células mL⁻¹ de algas foi preparada em meio Jaworski. A concentração inicial de células em cada teste foi de 10^6 células mL⁻¹ e os testes realizados em quadruplicatas para reduzir o desvio-padrão. Durante os testes, as amostras foram mantidas durante agitação constante (120 rpm) para manter as algas em suspensão e facilitar a transferência de CO₂. A temperatura foi mantida em 21 °C e a intensidade de luz em 3500 lux. As medidas foram realizadas após 96 h do início do experimento. As células foram contadas usando um microscópio (Brunel Microscopes, Model N-300M) e um contador de células (Celeromics).

Bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*: Os testes foram conduzidos de acordo com a ISO 11348-3:2007. Antes das análises, as amostras foram diluídas (1:9) com solução de NaCl para obtenção de um meio com salinidade 2 % (m/v). A substância de referência, dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), foi preparada pela adição de 0,653 g de K₂Cr₂O₇ em 100 mL de água deionizada e desta solução, uma diluição 1:100 usando solução de NaCl a 2% (m/v). A solução denominada “ISO Test Water” (OECD) foi utilizada como controle positivo. A solução contendo a bactéria marinha foi preparada pela adição de 11 mL da solução diluente (“BioFix Lumi Medium for freeze-dried luminiscent bacteria”) no vial contendo a bactéria liofilizada (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Para realizar os testes, vials foram inseridos em uma incubadora a 15 °C. 100 µL da suspensão de bactérias foram adicionados a cada vial e após 15 min, realizou-se a leitura inicial (I₀) utilizando-se de um luminômetro portátil (BioFix Lumi-10, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Um volume de 900 µL de cada amostra foi adicionado aos vials com intervalo de 30 s entre amostras. Após 30 min da leitura do primeiro vial, novas leituras foram realizadas em intervalos de 30 s (I₃₀). O “valor gama” (Ht) foi calculado utilizando-se a expressão:

$$Ht = \frac{I_{30}}{(I_0 f_{kt})} \times 100$$

onde f_{kt} é o fator de correção, I_{30}/I_0 , para o controle positivo.

Germinação de Sementes e Crescimento Radicular: para cada amostra, um círculo de “blotting paper” (papel de alta capacidade absorvente) de 150 g m⁻² foi colocado nas tampas de placas de Petri de 90 mm. A cada disco foram adicionados 2 mL de amostra. Entre 10 e 12 sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram colocadas em linha a cerca de ¾ de altura de cada placa. As placas foram deixadas na posição deitada por cerca de 5 min para auxiliar as sementes a aderir no papel. Um controle com “ISO Test Water” (OECD) foi realizado em duplicata. Cada placa de Petri foi embrulhada com plástico filme e colocada em posição semi-vertical em uma incubadora a 25 °C por 4 dias. Após este período, as placas foram examinadas, o número de sementes germinadas contado e o comprimento da raiz das sementes germinadas foi medido utilizando-se um paquímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de biodegradabilidade e produção de biogás do sistema em função da concentração de amoxicilina adicionada são apresentados no gráfico das Figuras 1 e 2, respectivamente. As barras de erro correspondem à incerteza da determinação em triplicata.

Figura 1: Estudo de biodegradabilidade da amoxicilina em função de sua concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).

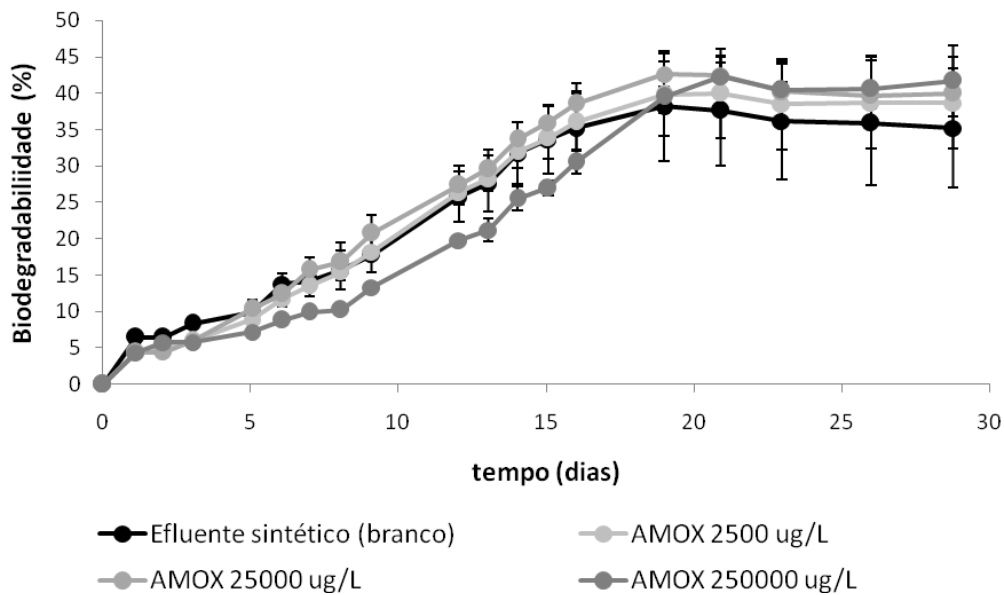
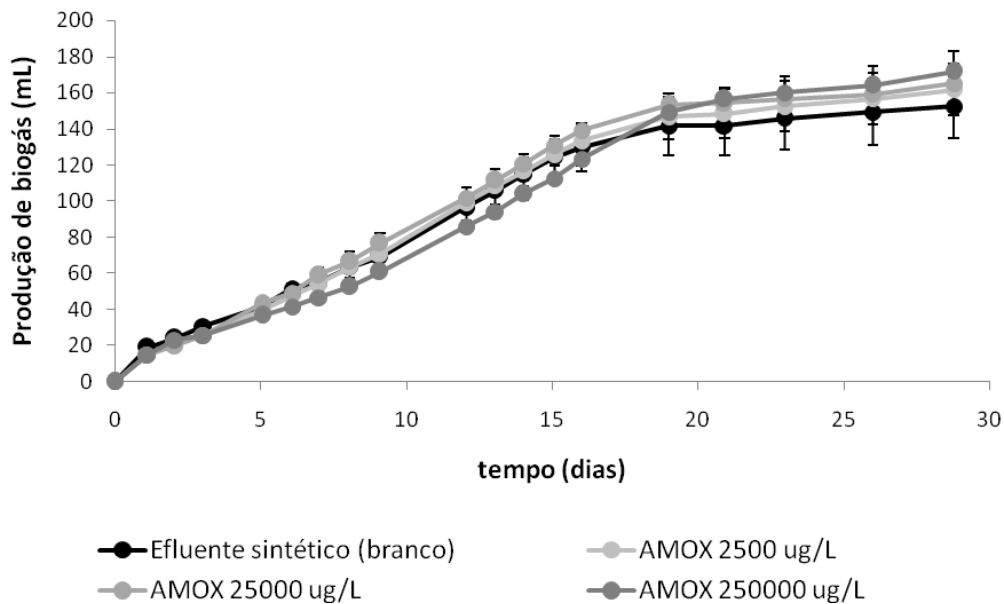
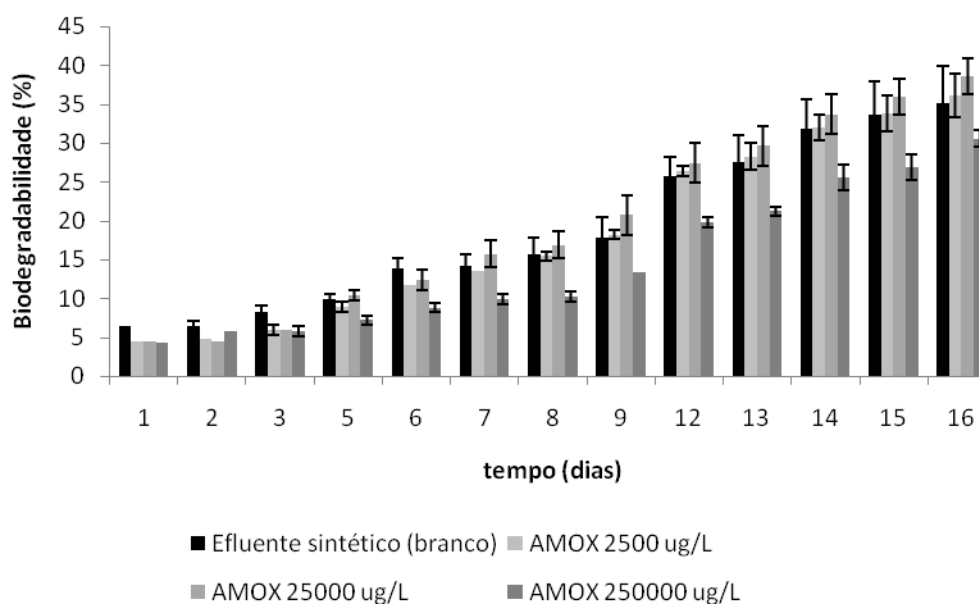


Figura 2: Produção de biogás no sistema em função da concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) de amoxicilina.



A Figura 3 compara os primeiros 16 dias do experimento com relação à biodegradabilidade de cada um dos sistemas estudados.

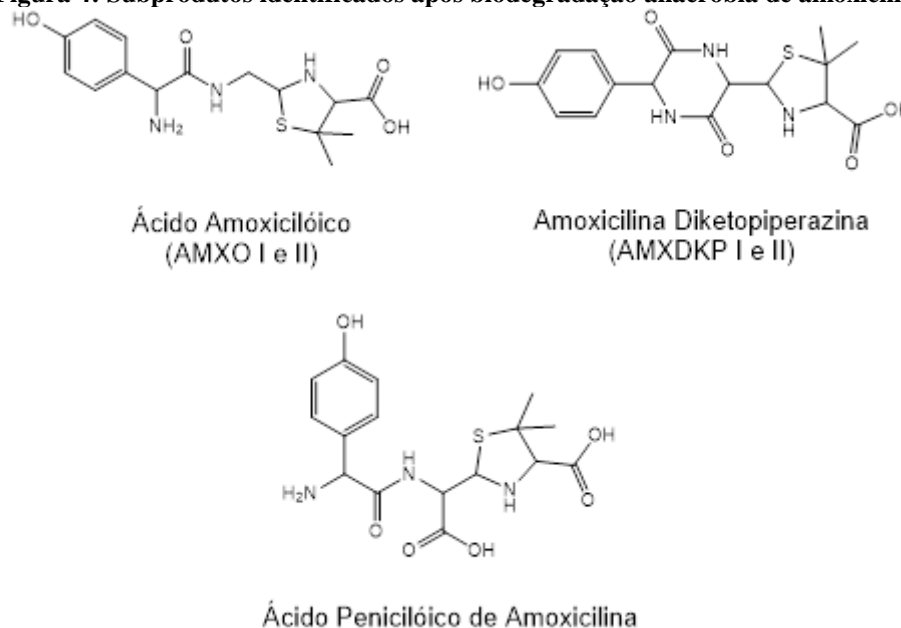
Figura 3: Comparação entre as seringas usando diferentes concentrações de amoxicilina ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos primeiros 16 dias de experimento.



Verificou-se por meio da análise do gráfico que apenas o sistema contendo $250000 \mu\text{g L}^{-1}$ de amoxicilina causou inibição na atividade biológica do sistema, refletida na menor produção de biogás para este sistema. Após os 28 dias de experimento todos os sistemas apresentaram taxas de biodegradabilidade equivalentes.

Em seguida, foram identificados pela técnica de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LCMS), os subprodutos de degradação da amoxicilina. Os compostos são apresentados na Figura 4:

Figura 4: Subprodutos identificados após biodegradação anaeróbica de amoxicilina.



Durante a análise cromatográfica, foram identificados quatro subprodutos com a transição $366,11 \rightarrow 160,0428$, além dos compostos ácido penicilóico de amoxicilina, amoxicilina diketopiperazina e ácido amoxicilóico I. Os três últimos compostos também foram identificados no trabalho de Pérez-Parada et al. (2011).

A análise por LCMS foi conduzida de forma a se obter a concentração final de cada um dos subprodutos identificados. Os resultados são apresentados na Tabela 3:

Tabela 3: Concentração de subprodutos ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontrados nas seringas após 28 dias de experimento.

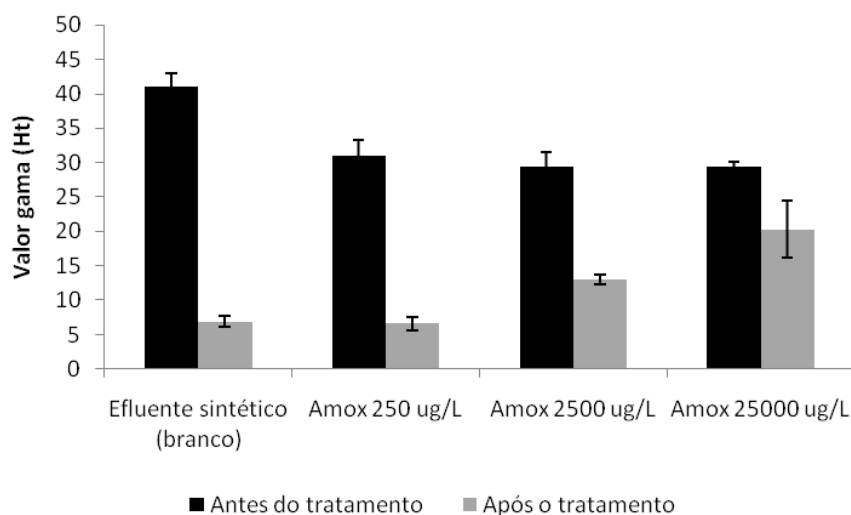
Subproduto	Amoxicilina 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$	Amoxicilina 25000 $\mu\text{g L}^{-1}$	Amoxicilina 250000 $\mu\text{g L}^{-1}$
366desconhecido1	14 \pm 1	180 \pm 20	2598 \pm 257
366desconhecido2	108 \pm 7	1047 \pm 97	15787 \pm 1084
366desconhecido3	127 \pm 3	1349 \pm 194	17010 \pm 1590
366desconhecido4	67 \pm 4	715 \pm 83	9970 \pm 774
Ácido Penicilóico de Amoxicilina	137 \pm 11	1477 \pm 245	5508 \pm 1153
AMXDKP1	124 \pm 4	1253 \pm 131	16613 \pm 1820
AMXDKP2	24 \pm 1	272 \pm 32	3890 \pm 259
AMXO1	18 \pm 2	251 \pm 64	1518 \pm 118

* 366desconhecido: compostos que possuem a transição 366,11 \rightarrow 160,0428; AMXDKP = amoxicilina diketopiperazina; AMXO = ácido amoxicilóico.

Concentrações proporcionais (calculadas com base na curva de calibração obtida para amoxicilina) de cada um dos subprodutos foram obtidas nas seringas em relação a concentração inicial do composto em cada sistema. A soma de todos os subprodutos correspondeu a 25, 26 e 29 % da concentração inicial do antibiótico nos sistemas contendo 2500, 25000 e 250000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A Figura 5 apresenta os resultados obtidos para a análise de toxicidade empregando a espécie *Aliivibrio fischeri*.

Figura 5: Efeito da amoxicilina e seus subprodutos na análise de *Aliivibrio fischeri* após 30 min de exposição às amostras antes e após tratamento de 28 dias.

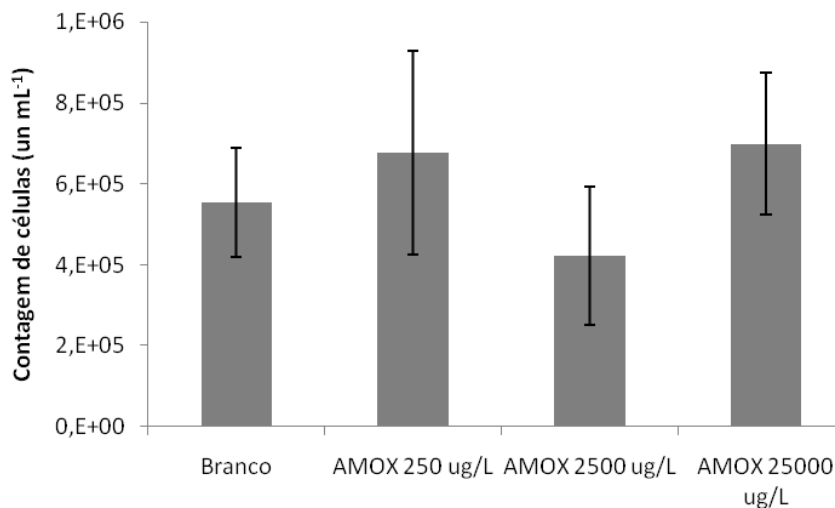


Para os sistemas antes do tratamento, foi observada inibição na fluorescência bacteriana em todos os sistemas, incluindo o branco, embora a inibição tenha sido superior para os sistemas contendo amoxicilina; não foi observada nenhuma correlação entre a fluorescência bacteriana e concentrações sucessivamente maiores de antibiótico.

Para as amostras após o tratamento, foi observado um aumento na fluorescência bacteriana conforme a concentração de subprodutos aumentou, indicando assim, estimulação dos mesmos sobre a espécie *Allivibrio fischeri*. Os menores valores de Ht em comparação com o sistema antes do tratamento podem ser explicados pela presença de partículas que não foram filtradas, o que reduziria a luminescência do sistema, assim como pela presença de bactérias presentes no inoculo utilizado no experimento.

A análise de toxicidade empregando a alga *Raphidocelis subcapitata* apresentou o seguinte resultado para as amostras tratadas após 28 dias (Figura 6):

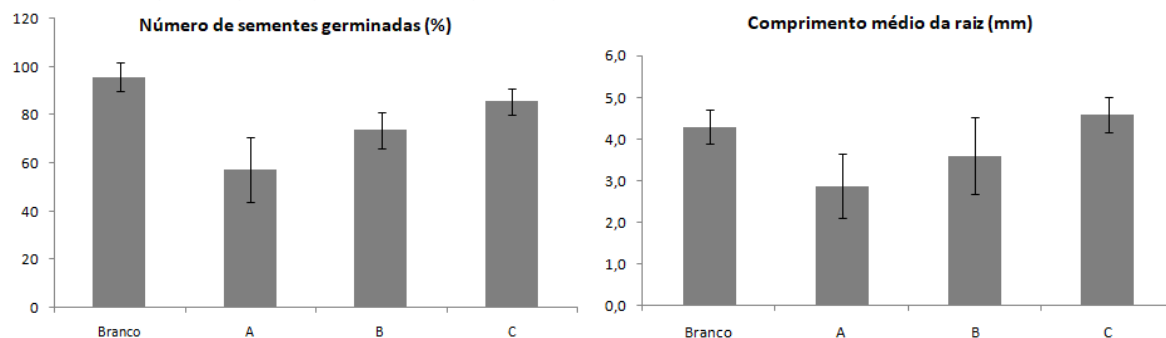
Figura 6: Efeito dos subprodutos de degradação da amoxicilina na contagem de células de *Raphidocelis subcapitata* (96 h) após 28 dias de tratamento.



Apesar das análises terem sido executadas em quadruplicata, obteve-se um alto desvio-padrão para este experimento. No entanto, a presença de subprodutos de degradação da amoxicilina parece não afetar o crescimento das algas.

Por fim, a Figura 7 apresenta os resultados obtidos no teste de Germinação de Sementes e Crescimento Radicular.

Figura 7: Resultados obtidos para o teste de Germinação de Sementes após 28 dias de experimento.



* Branco = efluente sintético, A: [AMOX] = 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, B: [AMOX] = 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$, C: [AMOX] = 25000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Verificou-se comportamento semelhante ao obtido para o teste empregando a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*. A presença de subprodutos ao final do experimento parece estimular tanto o número de sementes germinadas quanto o crescimento da raiz, muito embora os valores obtidos no sistema C não tenham sido superiores aos do branco (ausência de amoxicilina).

CONCLUSÕES

Apesar do antibiótico amoxicilina ser de fácil degradação por microrganismos sob condições anaeróbias, verificou-se a formação de diversos subprodutos de degradação ao final do período de 28 dias do experimento empregando o sistema com seringas e um efeito deletério sob a produção de biogás durante os primeiros 16 dias quando da utilização de concentração de antibiótico igual a 25000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes subprodutos, por sua vez,

parecem estimular tanto o crescimento de sementes de alface quanto a atividade luminescente da bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* quando presentes em elevadas concentrações. Por sua vez, não há aparente correlação entre a concentração de subprodutos e taxa de crescimento da alga *Raphidocelis subcapta*, o que indica a importância de se realizar análises de toxicidade utilizando organismos de diferentes níveis tróficos. Além disso, a estimulação causada em alguns dos organismos estudados não elimina o potencial tóxico do efluente para a saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHERNICHARO, C. A. L. Princípio do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores anaeróbios. Departamento de engenharia sanitária e ambiental – DESA/UFMG, Belo Horizonte, v. 5, 2ª edição, 380 p., 2007.
2. FERNADEZ, M.P., IKONOMOU, M.G., BUCHANAN, I., An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Science of the Total Environment*, v. 373, p. 250–269, 2007.
3. ISO 11348-3:2007. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
4. ISO 11734:1995. Water quality — Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.
5. LÓPEZ-DOVAL, J. et al. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. *Science of the Total Environment*, v. 575, p. 1307–1324, 2017.
6. OECD, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Publishing, Paris, 2011.
7. OOSTERHUIS, M., SACHER, F., TER LAAK, T. L. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data, *Science of the Total Environment*, v. 442, p. 380-388, 2013.
8. PÉREZ-PARADA, A. et al. Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 25, n. 6, p. 731-742, 2011.
9. SALGADO, R., NORONHA, J. P., OEHMEN, A., CARVALHO, G., REIS, M. A. M. Analysis of 65 pharmaceuticals and personal care products in 5 wastewater treatment plants in Portugal using a simplified analytical methodology. *Water Science Technology*, v. 62, n. 12, p. 2862-2871, 2010.
10. SOUZA, T. S. O. Desnitrificação autotrófica usando sulfeto como doador de elétrons para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbicos utilizados no tratamento de esgotos sanitários. São Paulo, 2011. Tese de Doutorado - Escola de Engenharia de São Carlos da USP.
11. VAN ELSAS, J.D., TAM, L., FINLAY, R.D., KILLHAM, K., TREVORS, J.T. In: VAN ELSAS, J. D., JANSSON, J. K., TREVORS, J. (eds). *Modern soil microbiology*, 2ª ed., CRC, Abington, United Kingdom, p 177, 2007.