

AValiação DO EFEITO INIBITÓRIO DOS ANTIBIÓTICOS SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIM SOBRE A MICROALGA *Monoraphidium contortum*

Guilherme Henrique da Silva Nogueira¹ (IC), Marcelo Chuei Matsudo (PQ)^{1,2}

¹Universidade Federal de Itajubá

²Universidade Federal do ABC

Palavras-chave: Biorremediação. Contaminante emergente. Efluente. Inibição. Microalga.

Introdução

Durante muito tempo, o trabalho realizado nas indústrias tem gerado inúmeras substâncias tóxicas para o meio ambiente em razão do aparecimento de diversos produtos para necessidade humana. Devido a isso, rejeitos gasosos, líquidos e sólidos são gerados constantemente e são na maioria das vezes descartados em corpos d'água sem ao menos passar por um tratamento adequado, contribuindo para a contaminação do ambiente (FREIRE *et al.*, 2000). Substâncias químicas novas e não regulamentadas como os contaminantes emergentes também são despejadas diariamente das residências em corpos aquáticos, aumentando a poluição e diminuindo a diversidade ambiental (SODRÉ *et al.*, 2007).

O lançamento de contaminantes emergentes em corpos de água como os antibióticos e seus produtos de degradação, podem ser prejudiciais ao meio ambiente. Estes compostos não são metabolizados totalmente pelo organismo humano e são excretados do corpo principalmente pelas fezes e urinas. Nas estações de tratamento de esgoto os antibióticos geralmente não são devidamente tratados, uma vez que estas não são projetadas para remoção de contaminantes emergentes, fazendo com que seu descarte indevido promova o desenvolvimento de resistência antimicrobiana e seus genes relacionados (Zhu *et al.*, 2019).

Antibióticos como o Sulfametoxazol (SMX) e Trimetoprim (TMP) vêm sendo amplamente utilizados no tratamento de doenças humanas e veterinárias e conseqüentemente acabam sendo descartados de forma indevida pelas ETE 's. Em efluentes de águas residuais advindos do tratamento secundário das ETE 's foram medidas concentrações de SMX e TMP variando de 2-1830 ng/L e 308-791 ng/L, respectivamente (LUBLINER *et al.*, 2010). Esse problema tornou-se uma preocupação de saúde emergente em todo o mundo e estratégias são necessárias para amenizar esses possíveis impactos no meio ambiente, como a utilização de culturas de microalgas (Wang *et al.*, 2016).

As microalgas absorvem a maioria dos nutrientes presentes em águas residuais, agrícolas e industriais

como nitrogênio, fosfato e carbonos orgânicos (Wang *et al.*, 2016). Diversos estudos constataram a eficiência de certas espécies de algas de água doce, para a remoção de compostos desreguladores endócrinos como o bisfenol A, além de descreverem o uso de microalgas para a remoção de diferentes tipos de contaminantes emergentes como os antibióticos (Gattullo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). Dessa forma, antes de avaliar a capacidade de microalgas em degradar os antibióticos considerados contaminantes emergentes, é preciso, inicialmente, verificar a concentração a partir da qual estes antibióticos inibem o crescimento da microalga. E este é justamente o objetivo deste trabalho. Conhecendo-se a concentração inibitória, na continuação deste trabalho, pretende-se adotar concentrações subinibitórias em testes de degradação dos contaminantes emergentes em contato com as microalgas com potencial de degradá-las.

Metodologia

Para a avaliação do efeito inibitório dos antibióticos Sulfametoxazol (SMX) e Trimetoprim (TMP) foi utilizado como inóculo a microalga *Monoraphidium contortum* (CCMA-UFSCar 698) que foi isolada em área de mangue do Núcleo Picinguaba do Parque Estadual da Serra do mar (Ubatuba/SP).

Foram realizados quatro cultivos em frascos de Erlenmeyer, variando-se as concentrações de antibióticos, e as posteriores análises estatísticas dos dados experimentais foram feitas por análise de variância (ANOVA) empregando-se o programa Minitab 17.

As microalgas foram mantidas em frascos de Erlenmeyer contendo aproximadamente 300 mL de meio Bold padrão (UTEX, 2010). Para o preparo do inóculo, uma pequena parte da suspensão celular foi adicionada a outros frascos de Erlenmeyer, contendo o mesmo meio de cultura estéril. Os frascos foram agitados (150 RPM) sob intensidade luminosa de aproximadamente 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} s^{-1}$, temperatura de 25°C e pH inicial em torno de 7,0.

Os quatro cultivos foram realizados em triplicata para cada uma das concentrações de SMX e TMP, sendo estas,

0,5 mg/L (C_{A1}), 1,0 mg/L (C_{A2}), 5,0 mg/L (C_{A3}), 10,0 mg/L (C_{A4}), 100,0 mg/L (C_{A5}) e 200,0 mg/L (C_{A6}), além do controle (C_{A0}), onde não houve adição de SMX e TMP. Foram utilizados 12 frascos de Erlenmeyer com capacidade de 500 mL em um tempo de 10 dias. O primeiro e o segundo cultivo foram realizados com o antibiótico SMX, sendo que o primeiro apresentou as seguintes concentrações C_{A4} , C_{A5} e C_{A6} e o segundo apresentou C_{A1} , C_{A2} e C_{A3} . O terceiro e quarto experimentos foram realizados com o antibiótico TMP, onde o terceiro apresentou concentrações C_{A1} , C_{A2} e C_{A3} e o quarto C_{A4} , C_{A5} e C_{A6} . Ambos os cultivos contaram com C_{A0} sendo responsável pelo controle como já mencionado anteriormente. O meio de cultura utilizado foi o BBM - Bold's Basal Medium (meio Bold) esterilizado.

Vale ressaltar que antes de cada procedimento foram executadas as etapas básicas e iguais para cada cultivo, sendo elas: preparo do meio padrão Bold e preparo do inóculo, detalhadas a seguir.

Preparo do Meio Bold: Para o preparo do inóculo e para o cultivo controle foi utilizado o meio Bold (UTEX, 2010), meio padrão para o crescimento da microalga. Inicialmente, foi autoclavado o meio contendo as soluções estoques de sais e a solução de metais (PIV). Após o esfriamento da solução, adicionou-se, em câmara de fluxo laminar, o Mix de vitaminas $mg.L^{-1}$ por meio de um filtro de 0,22 μm .

Preparo do inóculo: O preparo do inóculo foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, previamente autoclavados, contendo aproximadamente 300 mL de meio BOLD, e com inoculação de até 10% deste volume de suspensão celular. Estes foram deixados em agitação (150 rpm) e sob a incidência de luz por cerca de uma semana, de forma a se obter biomassa suficiente para se atingir a concentração inicial desejada no cultivo (50 mg/L) também realizado em frascos de Erlenmeyers.

Quantificação da biomassa: Para avaliar se o inóculo apresenta concentração adequada para a montagem do cultivo, foi feita a quantificação da biomassa por meio de espectrofotometria a 550 nm (BECKER, 1994). Os dados foram convertidos em concentração celular por meio da curva de calibração da *Monoraphidium contortum* que após regressão linear resultou na equação abaixo:

$$X = 0,5933 \times Abs_{550} - 0,0568 \quad (1)$$

A linearização da curva obtida é apresentada na Equação 1, na qual X representa a concentração celular

em $mg.L^{-1}$ e a Abs refere-se aos valores experimentais obtidos (absorbância em 550nm).

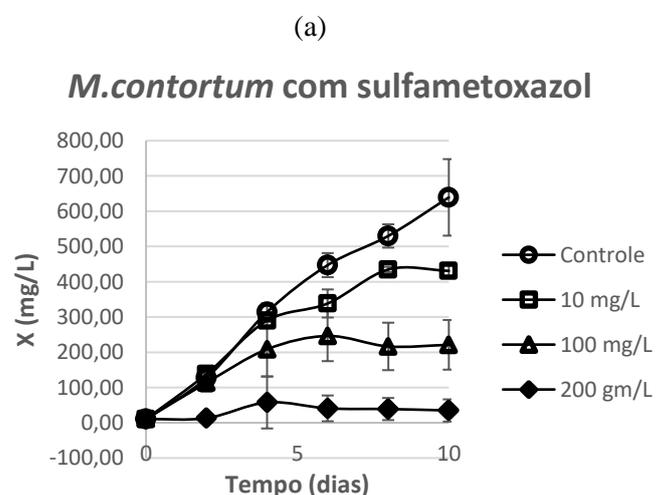
Cultivo em meio padrão Bold: Para a realização do primeiro cultivo foram preparados 1,2 litros de meio Bold estéril e com vitamina, conforme metodologia apresentada em preparo do Meio Bold. Para o preparo do inóculo, empregou-se a metodologia detalhada na quantificação da biomassa, obtendo-se o valor de $14,5 mg.L^{-1}$ como concentração inicial. Após a centrifugação da biomassa e a ressuspensão em meio Bold, os 1,2 litros foram divididos igualmente entre os 12 frascos Erlenmeyer, resultando 100 mL em cada um. Foram adicionadas em seguida, as concentrações de antibiótico em cada frasco de Erlenmeyer, com exceção do controle conforme descrito anteriormente, obtendo-se um pH inicial de 6,5. Foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente para os outros três cultivos encontrando-se concentrações iniciais em torno de 30 - 50 $mg.L^{-1}$ e pH inicial em faixas de 6,5 - 7.

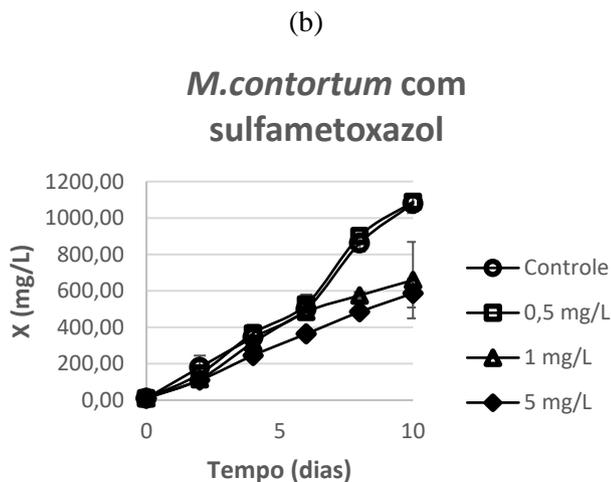
O crescimento foi então monitorado por meio das medições de absorbância e de pH de amostras retiradas em dias alternados, durante todo o período de cultivo e no mesmo horário do dia em que se iniciou.

Resultados e discussão

Após o término das medições de pH e absorbância durante os 10 dias, foi possível relacionar todos os dados coletados em um gráfico para que facilitasse a análise e compreensão dos resultados. Primeiramente foram realizados os cultivos com o antibiótico SMX, e o crescimento de ambos em função do tempo são representados na Figura 1 abaixo:

Figura 1: Crescimento da microalga *M. contortum* com SMX - primeiro cultivo (a) e segundo cultivo (b)





Ao analisar a Figura 1 (a), pode-se observar que houve inibição da microalga *M. contortum* pelo antibiótico SMX, visto que, ao analisar o controle (C_{A0}) nota-se um crescimento celular de $639 \frac{mg}{L}$ que é relativamente maior comparado às outras concentrações. No segundo dia de cultivo percebe-se que a C_{A6} inibiu consideravelmente o crescimento celular comparado às outras concentrações que se mantiveram constantes em torno de $120 \frac{mg}{L}$. Nos dias posteriores o crescimento em ambas as concentrações de SMX começaram a se distinguir demonstrando efeito inibitório sobre o crescimento da microalga. Com isso, foi realizado um novo cultivo sabendo que concentrações de $10 \frac{mg}{L}$ de SMX já inibiam o crescimento celular da *M. contortum*. Dessa forma, foram empregadas concentrações abaixo da C_{A4} no segundo cultivo, com o objetivo de encontrar uma concentração na qual a microalga não fosse inibida. Ao analisar o crescimento da microalga na Figura 1 (b) com as respectivas concentrações, pode-se notar que C_{A2} e C_{A3} inibiram o crescimento da microalga em comparação a C_{A1} que praticamente acompanhou C_{A0} . Dessa forma, uma análise estatística foi realizada para a melhor compreensão dos dados coletados. A análise estatística realizada permite inferir que as diferentes condições experimentais de cada concentração de SMX têm influência estatisticamente significativa no crescimento da microalga em questão.

Tabela 1 - Valores de [SMX] e (X_{10}) para o segundo cultivo

[SMX] ($mg \cdot L^{-1}$)*	X_{10} ($mg \cdot L^{-1}$)*
0,0	$1079,4 \pm 52,2^A$
0,5	$1088,6 \pm 31,3^A$
1,0	$659,0 \pm 210,0^B$
5,0	$586,8 \pm 78,3^B$

* Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente

De fato, na análise de variância ANOVA, obteve-se um baixo valor do nível descritivo: $p = 0,001$. Considera-se (X_{10}) nas análises que equivalem à concentração de biomassa no décimo dia de cultivo. Dessa forma, pode-se definir que a concentração de $0,5 \frac{mg}{L}$ de SMX não tem influência no crescimento da *M. contortum*, uma vez que pela análise estatística C_{A0} e C_{A1} não diferem entre si. Os resultados encontrados são consistentes com trabalhos realizados anteriormente, que mostram que o antibiótico SMX pode ser considerado tóxico para as microalgas, isso porque, seu mecanismo de ação age danificando estruturas celulares e organelas ao perturbar a homeostase do controle de espécies reativas de oxigênio e transdução de energia, logo, concentrações altas de antibiótico podem realmente inibir o crescimento destas (Eguchi *et al.*, 2004; Isidori *et al.*, 2005).

Por fim, foram realizados os dois últimos cultivos com o antibiótico TMP. Ambos apresentaram baixa eficiência nos dados obtidos, uma vez que ao realizar a análise de variância ANOVA obteve-se um alto valor do nível descritivo, $p > 0,05$.

Tabela 2 - Valores de [TMP] e (X_{10}) para o primeiro cultivo

[TMP] ($mg \cdot L^{-1}$)*	X_{10} ($mg \cdot L^{-1}$)*
0,0	$1054,0 \pm 212,0^A$
0,5	$977,9 \pm 105,4^A$
1,0	$1126,3 \pm 93,7^A$
5,0	$1002,4 \pm 57,1^A$

* Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente

Tabela 3 - Valores de [TMP] e (X_{10}) para o segundo cultivo

[TMP] ($mg \cdot L^{-1}$)*	X_{10} ($mg \cdot L^{-1}$)*
0,0	$1240,0 \pm 190,0^A$
10,0	$1440,4 \pm 124,8^A$
100,0	$1145,8 \pm 149,3^A$
200,0	$1026,0 \pm 248,0^A$

* Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente

Com isso, pode-se certificar que as concentrações de TMP presentes no primeiro e no segundo cultivo não afetam o crescimento da microalga em questão. Entretanto, segundo estudos realizados por Eguchi *et al.* (2004), o TMP apresentou efeito inibitório sobre uma outra microalga, *Selenastrum capricornutum*, comprovando seu efeito toxicológico sobre as Clorófitas. Um dos motivos pelo qual o TMP não inibiu o crescimento da *M. contortum* no trabalho em questão, pode estar relacionado à baixa solubilidade deste antibiótico em água. Pois como citado na metodologia, foi realizada a dissolução deste em água destilada. Ao

consultar a literatura, foi constatado que no trabalho realizado por Isidori *et al.* (2005) foi utilizada uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver diversos antibióticos. Logo, pesquisas futuras serão realizadas para a compreensão da solubilidade do TMP em um solvente antes de adicioná-lo em um meio de cultura, e assim reavaliar seu efeito inibitório sobre a microalga *M. contortum*.

Conclusões

O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração inibitória dos antibióticos considerados contaminantes emergentes (SMX E TMP) sobre o crescimento da microalga *M. contortum*. Com isso, verificou-se que o antibiótico SMX apresentou efeito inibitório a partir de concentrações na faixa de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e a concentração de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ não apresentou diferença em relação ao ensaio controle, ou seja, não apresentaram caráter tóxico sobre a microalga. Além disso, os resultados encontrados condizem com a literatura, onde aponta o Sulfametoxazol como sendo potencialmente tóxico para as microalgas em altas concentrações. No entanto, o antibiótico TMP não apresentou efeito inibitório mesmo em cultivos com uma concentração de até $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, o que não está de acordo com a literatura, visto que este antibiótico afetou o crescimento da microalga verde *Selenastrum capricornutum*. Problemas relacionados à dissolução deste antibiótico podem ser justificados como possível causa da não inibição, sendo que o TMP apresenta baixa solubilidade em água e os experimentos foram realizados utilizando-se água destilada como solvente. Dessa forma, novos ensaios deverão ser realizados com o foco em garantir a dissolução correta do antibiótico TMP e assim identificar as concentrações que apresentam efeito inibitório deste antibiótico sobre a *M. contortum* para que, assim, pesquisas futuras possam ser feitas visando a compreensão da capacidade desta microalga em degradar tais antibióticos de águas residuais.

Agradecimento

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fornecimento da bolsa por meio do Programa de Apoio à Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC).

Referências

BECKER, E. W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. 1 ed Cambridge: Cambridge University Press, 293 p. 1994.

EGUCHI, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y. S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., & Yoshimura, H. (2004). *Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae*. *Chemosphere*, 57(11), 1733–1738.

FREIRE, R. S., Pelegrini, R., Kubota, L. T., Durán, N., & Peralta-Zamora, P. (2000). **Química nova: Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas.**

GATTULLO, C. E., Bähns, H., Steinberg, C. E. W., & Loffredo, E. (2012). *Removal of bisphenol A by the freshwater green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter*. *Science of the Total Environment*, 416, 501–506.

ISIDORI, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., & Parrella, A. (2005). *Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms*. *Science of the Total Environment*, 346(1–3), 87–98.

LUBLINER, B, M. Redding, D. Ragsdale. *Pharmaceuticals and Personal Care Products in Municipal Wastewater and Their Removal by Nutrient Treatment Technologies*. *Washington State Department of Ecology*, Olympia, WA, 2010, publication number 10-03-004.

SODRÉ, F.; LOCATELLI, M.; MONTAGNER, C.; JARDIM, W. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. *Caderno temático*, vol. 6, 2007.

UTEX. *The Culture collection of algae*. *University of Texas at Austin*. < <http://www.sbs.utexas.edu/utex/default.aspx> >

WANG, Y., Ho, S-H., Cheng, C-L., Guo, W-Q., Nagarajan, D., Ren, N-Q., Lee, D-J., Chang, J-S., *Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment*, *Bioresource Technology* (2016).

ZHU, S., Huo, S., Feng, P., 2019. *Developing Designer Microalgal Consortia: A Suitable Approach to Sustainable Wastewater Treatment*. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*. Springer, p. 569–598.