

Eixo Temático ET-09-015 - Biologia Aplicada

PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O ESTUDO DA REMOÇÃO DE ANTIBIÓTICOS, AMOXILINA E CEFALEXINA, USANDO BAGAÇO DE FEIJÃO VERDE COMO ADSORVENTE NATURAL

Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar¹, Luana Beatriz Correia de Oliveira¹,
Andressa Nathally¹, Anastássia Mariáh Nunes de Oliveira Lima²,
Laís Ludmila de Albuquerque Nerys², Abene Silva Ribeiro³,
Léa Elias Mendes Carneiro Zaidan¹, Olga Martins Marques¹, Valmir Felix de Lima¹,
Guilherme Antonio de Souza Silva¹, Iranildo José da Cruz Filho²,
Sara Horácio de Oliveira Maciel¹

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Engenharia Química, PE.

²Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos, PE.

³Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Química Fundamental, PE.

RESUMO

Desde a descoberta da penicilina, que os antibióticos vêm modificando o cotidiano da sociedade permitindo uma maior longevidade e uma qualidade de vida para os cidadãos. Entretanto, esses fármacos são excretados pela urina e fezes e acabam depositados nos rios, lençóis freáticos e nos efluentes das estações de tratamento de água onde não conseguem ser tratados e acabam voltando para as águas de abastecimento. Assim novas pesquisas para o desenvolvimento de técnicas de remoção vem se tornando mais frequentes. Uma boa alternativa é o uso de biossorventes por serem resíduos vegetais produzidos em larga escala e de fontes renováveis. Esse trabalho, portanto, tem como objetivo estudar os fatores que influenciam na adsorção de uma mistura de antibióticos, amoxicilina e cefalexina, através de um planejamento fatorial. Onde 11 ensaios de remoção foram realizados utilizando bagaço de feijão verde como material biossorvente modificando-se as variáveis: a quantidade de biomassa (0,5, 1,5, 2,5g), o pH (2, 7 e 12) do efluente e a concentração da mistura binária dos antibióticos (10, 50 e 90 mg/L). Cada ensaio foi utilizado 100mL da mistura mantida a 30 °C, por 24h, 150 rpm. O melhor ensaio para a remoção da amoxicilina e cefalexina, respectivamente, foi obtido nas seguintes condições: pH=12; 0,5g de bagaço de feijão e 90mg/L de concentração inicial da mistura de antibióticos obtendo respectivamente percentual de remoção de 88,2 e 86,69% indicando que a o uso de bagaço de feijão é uma alternativa eficaz para tratamento de efluentes contaminados.

Palavras-chave: Biossorventes; Remoção de fármacos; Tratamento de efluentes.

INTRODUÇÃO

Desde o início da humanidade, vários compostos são utilizados no combate e tratamento de doenças. Entre esses compostos destacam-se os antibióticos. Os antibióticos são substâncias sintéticas ou naturais usadas como antifúngicos, bactericidas ou antitumorais (Bell,2014). Por sua eficácia diante de diversos grupos de bactérias gram positivas e negativas e larga utilização em vários setores da sociedade, indústria, medicina, medicina veterinária e aquicultura, os antibióticos são cada vez encontrados em diferentes tipos de matrizes de água e solo (SIM et al, 2011). Dessa forma, os antibióticos são encontrados em várias amostras de efluentes na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} para efluentes hospitalares, de indústrias farmacêuticas e para de estações de tratamento de água (Homen,2011).

Dessa maneira, como esses fármacos são fabricados para terem uma certa estabilidade afim de que possam cumprir integralmente a sua finalidade, uma grande parte desses antibióticos ingeridos no tratamento de doenças são eliminados pelas fezes e urina sem alteração ou metabolizados parcialmente. A presença desses contaminantes, portanto, nesses efluentes é

um indicativo que os métodos convencionais não são suficientes para removê-los e os mesmos acabam voltando para as águas de rios e lagos e posteriormente para as águas de abastecimento (Kümmerer, 2009).

Para a remoção desses contaminantes do meio ambiente, emprega-se o carvão ativado como adsorvente, porém esse material custa caro e é de difícil regeneração. Por isso, resíduos vegetais, biomassa, de processos de larga escala e de fontes renováveis vem sendo cada vez mais pesquisados por ser uma alternativa eficiente e barata em relação ao carvão ativado (MOROT et al., 2017)

O objetivo desse trabalho é estudar a remoção de uma mistura binária de antibióticos, amoxicilina e cefalexina, por adsorção em bagaço de feijão verde por meio de um planejamento fatorial (Barros Neto, 2010) envolvendo três variáveis: a concentração da mistura de antibióticos, da biomassa e do pH da solução final e avaliar a melhor condição para uma maior remoção desses fármacos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Antibióticos utilizados no estudo

Os compostos usados neste o estudo foram: amoxicilina e cefalexina (Figura 1) cujas massas e formulas moleculares são respectivamente iguais a: $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, 65,4 g/mol e $C_{16}H_{17}N_3O_4S$, 347,39 g/mol. Eles apresentam comprimento de onda de máxima absorção na faixa de 240 e 260nm respectivamente. Esses compostos foram escolhidos por apresentar persistência no meio ambiente e serem bastante difundidos nos sistemas de saúde e consumidos pela população por serem de amplo espectro atuando em bactérias gram positivas e gram negativas.

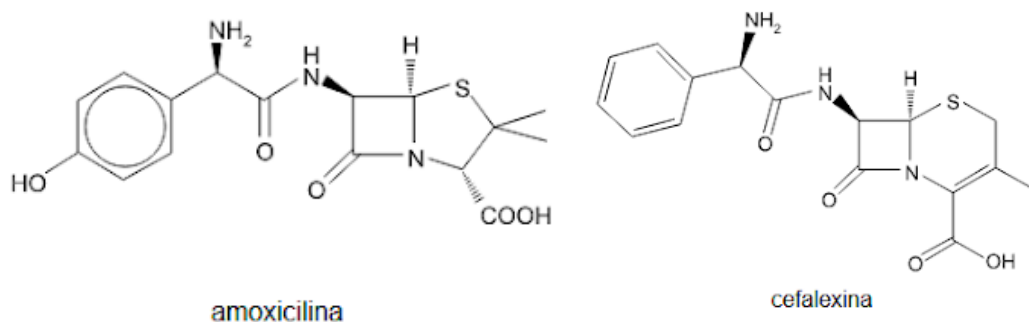


Figura 1. Exemplos de antibióticos β -lactâmicos do grupo da penicilina (amoxicilina) e do grupo das Cefalosporinas (cefalexina) Fonte: DE PAULA et al. (2010) e HOMEN (2011)

Obtenção e preparo do biossorvente

O biossorvente utilizado neste trabalho foi o bagaço de feijão. Esse material foi adquirido na feira pública no município de Nazaré da mata, Pernambuco, Brasil (Latitude: 7° 44' 32" Sul, Longitude: 35° 13' 52" Oeste). Com a finalidade de uniformizar o tamanho das partículas do material, foi triturado cerca de 200g desse material e foram secos a 105°C, por 72 h. Posteriormente, tamisou-se essa massa em peneiras de Tyler (1,43 mm).

Planejamento fatorial para os ensaios de biossorção

Para avaliar o percentual de remoção desses antibióticos, foi empregado um planejamento fatorial 2^3 , totalizando 11 experimentos (Barros Neto et al., 2010). As variáveis estudadas foram: pH 2,0, 7,0 e 12,0, concentração da mistura de antibióticos: 90, 50 e 10mg/L e a quantidade de biomassa 0,5, 1,5 e 2,5g. As soluções das misturas de antibióticos, amoxicilina e cefalexina, foram obtidas a partir de uma solução estoque de 500mg/L preparada pela dissolução desses antibióticos vendidos comercialmente em 1L de água destilada. A partir da diluição da solução estoque, obtiveram-se as soluções de 90, 50 e 10mg/L. O ajuste do pH da

solução final foi realizado com a adição de uma solução de ácido sulfúrico 3M ou de hidróxido de sódio 3M. O volume final em cada ensaio foi de 100 mL e os ensaios foram realizados em um período de 12h.

Determinação da concentração dos fármacos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Ao término de cada ensaio, filtrou-se uma alíquota em membranas de 0,45µm de porosidade. Quantificaram-se os antibióticos em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), pertencente à Central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE com detector UV/Vis utilizando-se as seguintes condições: coluna Phenomenex gemini C18, 3µm 50 x 2,1mm, fase móvel (água e acetonitrila grau CLAE com 1% de ácido fórmico), vazão da fase móvel 0,4mL/min e volume de injeção 25 µL. Os comprimentos de onda usados para identificação da amoxicilina e da cefalexina foram de 240 e 260nm respectivamente. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória e a resposta foi avaliada em função do percentual de remoção R (%) calculado pela Equação 1. As análises foram realizadas utilizando o software Statistica® 8.0.

$$R(\%) = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100\% \text{ (Eq. 1)}$$

Onde: C_0 é a concentração inicial do antibiótico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e C_f é a concentração do antibiótico ao final do processo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Planejamento experimental

Com o objetivo de avaliar as melhores condições experimentais para os ensaios de remoção, foi realizado um planejamento fatorial para o processo de adsorção da mistura de antibióticos em bagaço de feijão. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado do planejamento fatorial 2^3 para o ensaio de adsorção para a remoção de uma mistura binária de amoxicilina e cefalexina usando bagaço de feijão verde como adsorvente.

Ensaio	pH	Biomassa (g)	Concentração mg/L	% Remoção de amoxicilina	% Remoção Cefalexina
1	2	0,5	10	28,3	4,68
2	12	0,5	10	50,0	32,11
3	2	2,5	10	0,0	0,0
4	12	2,5	10	0,0	0,0
5	2	0,5	90	84,8	83,53
6	12	0,5	90	88,2	86,69
7	2	2,5	90	65,0	60,61
8	12	2,5	90	62,6	58,32
9	7	1,5	50	52,7	43,94
10	7	1,5	50	53,1	44,26
11	7	1,5	50	51,4	41,57

A amoxicilina é uma molécula capaz de reagir com bases e ácidos, ou seja, é um composto anfótero capaz de sofrer protonação (adição de H) e desprotonação (retirada de H) (BEZERRA, 2016). Por isso ela possui três constantes de dissociação $pK_{a1} = 2,68$, $pK_{a2} = 7,49$ e $pK_{a3} = 9,63$ e se apresenta na forma de zwitterion a valores de pH entre 3 e 6 (Figura 2). Já a cefalexina possui $pK_{a1} = 3,5$ e $pK_{a2} = 7,44$ (Wilson, 1998; Kluza, 1978).

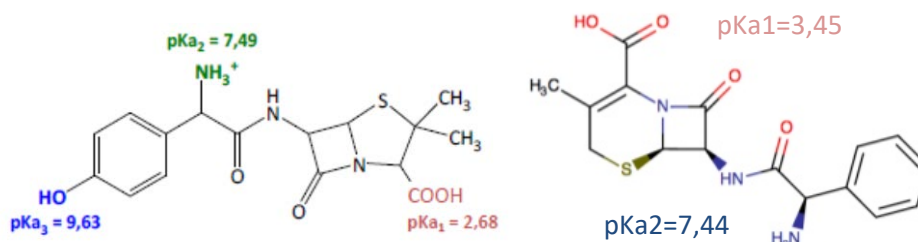


Figura 2. pKas da amoxicilina e da cefalexina.

Portanto, em $\text{pH}=2$, a molécula de amoxicilina está com o grupo carboxila desprotonado, $-\text{COO}^-/-\text{NH}_3^+/-\text{OH}$ enquanto a cefalexina ainda não estará. Já no $\text{pH}=7$ a amoxicilina se encontrará na forma $-\text{COO}^-/-\text{NH}_3^+/-\text{OH}$ e a cefalexina terá a sua carboxila desprotonada. A $\text{pH} = 12$, amoxicilina se encontra na forma $-\text{COO}^-/-\text{NH}_2/-\text{O}^-$ enquanto a cefalexina continuará com a sua carboxila desprotonada. Assim, a partir dos resultados da tabela 1, observa-se que o aumento de pH do meio favorece a desprotonação dos grupos carboxilas, amina e hidroxilas presentes nesses antibióticos aumentando o grau de ionização e conseqüentemente uma maior interação eletrostática com a superfície do biossorbente a qual deve está positivamente carregada (Homen, 2011; Nascimento, 2017).

Observando-se a Tabela 1, nota-se também que o aumento, de 10 para 90, da concentração da mistura de antibióticos (pares de ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 4 e 4 e 8) possibilita uma maior remoção desse poluente do meio. Isso está relacionado com o aumento da transferência de massa entre as fases devido à maior força motriz ocasionada pela maior diferença no gradiente de concentração dos antibióticos na fase líquida e do bagaço de feijão (Cruz, 2016; Nascimento, 2017).

Já para relação ao aumento, de 0,5 para 2,5g, da biomassa e a eficiência de remoção da mistura, (pares de ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7 e 6 e 8) observa-se uma redução na concentração da amoxicilina e da cefalexina na fase fluida e, portanto, uma diminuição da força motriz devido ao maior número de sítios disponíveis para a adsorção dos antibióticos pelo bagaço do feijão. (Piccin et al., 2011).

Também se realizou uma análise estatística dos resultados da Tabela 1, usando-se o software Statistica e adotando-se um nível de significância de 95%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros com valores de $p < 0,05$. Os resultados foram obtidos através da análise de resíduos, e a qualidade do ajuste do modelo baseada na ANOVA cujos resultados podem ser observados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2, Teste da análise de variância do modelo previsto para os valores de degradação do amoxicilina, ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g. l.	Média quadrática	F Calculado	F Tabelado
Regressão	8469,278	7	1209,897	63,739	8,89
Resíduos	56,947	3	18,982		
Falta de ajuste	55,367	1	55,367	70,084	15,81
Erro puro	1,58	2	0,79		
Total	8526,225	10			
% Variação explicada: 99,93%					
% Máxima de variação explicada: 99,98%					

Tabela 3: Teste da análise de variância do modelo previsto para os valores de degradação do cefalexina, ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g. l.	Média quadrática	F Calculado	F Tabela
Regressão	9340,555	7	1334,365	221,067	8,89
Resíduos	18,110	3	6,036		
Falta de ajuste	13,791	1	13,791	6,387	15,81
Erro puro	4,318	2	2,159		
Total	9358,665	10			

% Variação explicada: **99,80%**
% Máxima de variação explicada: **99,95%**

A Figura 3 (a,b) mostra o diagrama de Pareto para a amoxicilina e cefalexina. O qual apresenta a significância dos efeitos, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de $p=0,05$, confirmando os resultados obtidos nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. As alturas das barras fornecem os resultados dos efeitos das variáveis. Além disso a Figura 4 mostra também o gráfico dos valores preditos e observados (c,d) da amoxicilina e do cefalexina, respectivamente.

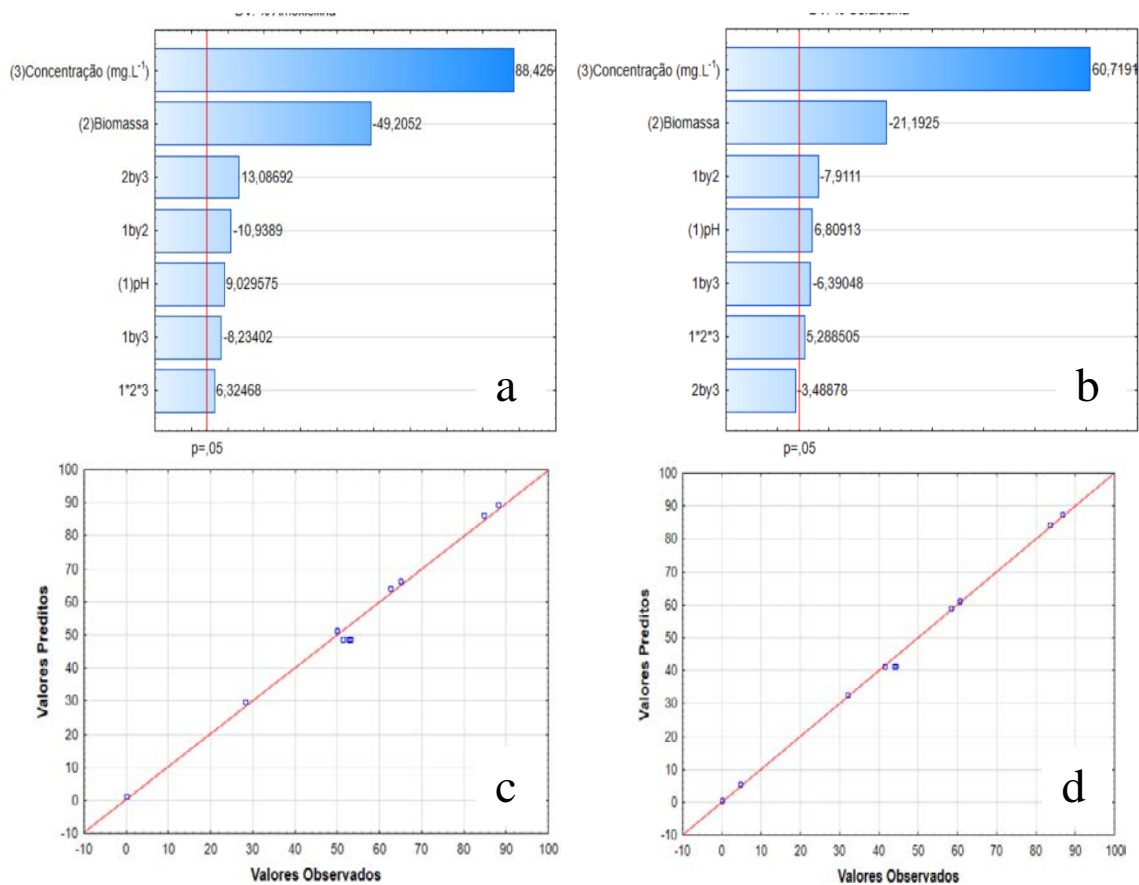


Figura 3. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2^3 para a amoxicilina (a) e para a cefalexina (b). Linha tracejada indica o valor no nível de significância (σ) de 5%. Diagrama de preditos versus observados da amoxicilina (c) e cefalexina (d).

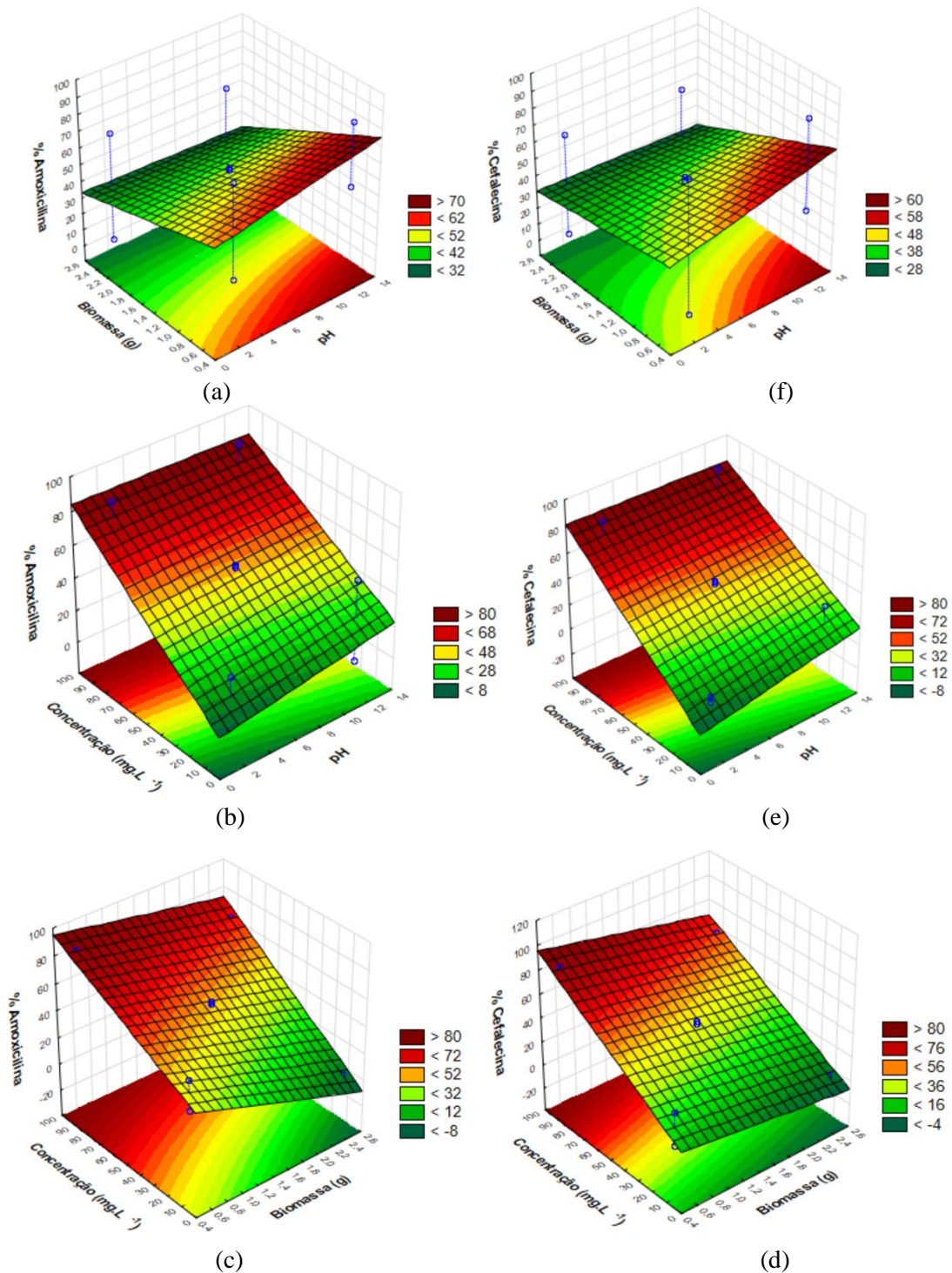


Figura 4. Superfície de resposta da interação entre o pH e a quantidade de bioissorvente (a,f), o pH e concentração (b,e) e a concentração e o bioissorvente (c,d), tendo como resposta à remoção da amoxicilina e da cefalexina respectivamente.

Pela análise dos efeitos de interação das variáveis estudadas apresentados na Figura 3(a) e 3(b), observa-se que a quantidade de bioissorvente e a concentração apresentaram efeito negativo para a amoxicilina e a cefalexina, isto é, condições de menores quantidade de bioissorvente e de cefalexina se tem maior remoção. De acordo com estes gráficos, verificou-se que os valores calculados, apresentam uma distribuição uniforme em relação à linha de

tendência significando que os desvios positivos e negativos estão na mesma proporção, não havendo um comportamento tendencioso. O planejamento fatorial completo 2³ auxiliou na obtenção das melhores condições para maior eficiência de remoção dos antibióticos.

A Figura 4 mostra o gráfico de superfície de resposta, na qual é possível verificar comparativamente a influência das variáveis na remoção dos antibióticos, corroborando com os resultados observados no Diagrama de Pareto.

As regiões onde o percentual de remoção é maior são representadas pelas regiões vermelho, enquanto as verdes apresentam os menores valores para a variável considerada. Nota-se, pela superfície de resposta, que o pH não interfere no percentual de remoção dos antibióticos, e que quanto maior a concentração de antibiótico, maior será a diferença de concentrações na fase fluida e no biossorvente, aumentando a força motriz que causa a transferência de massa (PICCIN et al., 2011). Pelo fato do pH não influenciar na remoção dos antibióticos, isso faz com que haja o barateamento do processo, pois não há a necessidade de ajustá-lo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a adsorção em bagaço de feijão verde para mistura de antibióticos: amoxicilina e cefalexina, antibióticos amplamente empregados em diversos setores como indústrias farmacêuticas, na medicina, medicina veterinária e na aquicultura, é uma promissora alternativa de adsorventes naturais provenientes de fontes renováveis, para ser utilizado em estações de tratamento de água e efluentes aumentando, assim, o valor agregado aos produtos da cadeia do feijão além de minimizar o lançamento desses contaminantes nos solos, lençóis freáticos e rios preservando o equilíbrio terrestre e aquático.

REFERÊNCIAS

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- BELL, V. **Introdução dos antibióticos em Portugal: ciência, técnica e sociedade (anos 40 a 60 do século XX)**. Estudo de caso da penicilina. Introdução dos antibióticos em Portugal: ciência, técnica e sociedade (anos 40 a 60 do século XX). Estudo de caso da penicilina. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2014. (Tese de doutoramento em Ciências Farmacêuticas, área de especialização em Sociofarmácia).
- BEZERRA, I. M. **Estudo dos equilíbrios sólido-líquido presentes na síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos**. Salvador, 2016. (Tese de doutorado em Engenharia Química).
- CRUZ, I. J.; Marques, L. M.; Souza, K. C.; Lima, V. F.; Marques, O. M.; Nascimento Junior, A. J. Remoção do corante Remazol Black B pelo uso da biomassa mista de *Aspergillus niger* e capim elefante (*Pennisetum purpureum schum*). **Engevista**, v. 18, n. 2, p. 265-279, 2016.
- HOMEM, V. M. F. C. **Tecnologias alternativas de remoção de antibióticos de águas contaminadas**. Porto: Universidade do Porto, 2011. (Dissertação de doutorado).
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment: A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, 2009.
- MOROT, H. F.; MALUCELLI, O.; CARVALHO FILHO, M.; VASCONCELOS, E. Adsorption of pharmaceuticals in water through lignocellulosic fibers synergism. **Chemosphere**, v.171, p. 57-65, 2017.
- NASCIMENTO, A. C. C.; CRUZ FILHO, I. J.; LIMA, V. F.; NASCIMENTO JUNIOR, A. J.; MARQUES, O. M. Biossorção do corante índigo carmim por *Pennisetum purpureum*

Schumach. 1827 (Poales: Poaceae) (Capim elefante). **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 2, n. 1, p. 44-49, 2017.

PICCIN, J. S.; DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; PINTO, L. A. A. Kinetics and mechanism of the food dye FD&C Red 40 adsorption onto chitosan. **Journal of Chemical & Engineering**, v. 56, p. 3759-3765, 2011.

SIM, W.-J.; LEE, J.-W.; LEE, E.-S.; SHIN, S.-K.; HWANG, S.-R.; OH, J.-E. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**, v. 82, p. 179-186, 2011.