



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental



Aline Gomes de Oliveira Paranhos

**EFEITOS DA TILOSINA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DO RESÍDUO AVÍCOLA:
PRODUÇÃO DE BIOGÁS, RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E COMUNIDADE
MICROBIANA**

Ouro Preto | MG

2021

Aline Gomes de Oliveira Paranhos

**EFEITOS DA TILOSINA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DO RESÍDUO AVÍCOLA:
PRODUÇÃO DE BIOGÁS, RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E COMUNIDADE
MICROBIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva

Ouro Preto | MG

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P223e Paranhos, Aline Gomes de Oliveira .
Efeitos da tilosina na digestão anaeróbia do resíduo avícola: produção de biogás, resistência a antibióticos e comunidade microbiana. [manuscrito] / Aline Gomes de Oliveira Paranhos. - 2021.
182 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino.
Coorientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.
Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Biodigestão. 2. Antibióticos em medicina veterinária. 3. Energia - Fontes alternativas. 4. Indústria avícola - cama de aviário. 5. Aviário - Pré-tratamento hidrotérmico. 6. Sustentabilidade e meio ambiente. I. Aquino, Sérgio Francisco de. II. Silva, Silvana de Queiroz. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 502:004

Bibliotecário(a) Responsável: Maristela Sanches Lima Mesquita - CRB-1716



FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Gomes de Oliveira Paranhos

Efeitos da tilosina na digestão anaeróbia de resíduo avícola: produção de biogás, resistência a antibióticos e comunidade microbiana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutora.

Aprovada em 30 de abril de 2021

Membros da banca

Dr. Sérgio Francisco de Aquino - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Silvana de Queiroz Silva - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Airtton Kunz - Embrapa Suínos e Aves
Dra. Juliana Calábria de Araújo - Universidade Federal de Minas Gerais
Dr. Bruno Eduardo Lobo Baeta - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Robson Jose de Cassia Franco Afonso - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Sérgio Francisco de Aquino, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 01/06/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Francisco de Aquino, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/06/2021, às 22:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0177931** e o código CRC **20AF221B**.

Aos meus amados avós Tita e Jaci, que residem em meu coração:
“Que o ódio deixe lugar ao amor, a mentira à verdade, a vingança ao perdão,
e a tristeza à alegria”

Papa Francisco

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida com saúde, por sempre me guiar pelo melhor caminho e me iluminar com tantas oportunidades de crescimento e tantas pessoas maravilhosas ao meu redor. Aos meus santos Nossa Sra. das Graças e Frei Galvão, por me protegerem de todo e qualquer mal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino, pelo aceite na orientação; por toda a experiência transferida à mim; pela grande confiança e comprometimento em todas as etapas de execução do projeto; por me deixar livre em conduzir o projeto ao meu gosto, mas nunca “soltar a minha mão”; pela infinita paciência com o meu “perfeccionismo” – até porque somos muito parecidos; pelos “puxões de orelha” necessários; pela amizade e confiança construída durante esses 4 anos; e por me proporcionar grandes oportunidades de crescimento pessoal e profissional. O seu exemplo profissional sempre estará presente em minha carreira!

À minha coo-orientadora, Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva, pelo aceite na orientação; por toda paciência em me ensinar e orientar em uma área completamente desconhecida por mim; pela doçura no trato à todas as questões relacionadas à mim; e por me proporcionar grandes oportunidades de crescimento pessoal e profissional. O seu exemplo de mulher pesquisadora sempre estará presente em minha carreira!

À Universidade Federal de Ouro Preto, minha universidade natal, pelo suporte, infraestrutura para realização da pesquisa e por todas as oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento nº 001) pelo suporte financeiro recebido por meio da bolsa de doutorado. Às demais agências de fomento / instituições: Fundação Nacional de Saúde – FUNASA (2510001557612017-21); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (423101/2018-8); Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ-02701-18), pela confiança no projeto e aporte financeiro para realização do mesmo.

À Avivar Alimentos, por meio dos veterinários Adriano Torelli e Samuel Bottrel, por toda ajuda no desenvolvimento do projeto, no fornecimento do resíduo, pelas informações e dicas, e pela disponibilidade constante em todos os momentos. Muito obrigada!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (ProAmb), por meio dos seus coordenadores durante esses 4 anos, Prof. Dr. Versiane Leão; Profa. Dra. Aparecida Mageste e Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta, e pela secretária Christiane Miranda, pela compreensão em todas as questões burocráticas relacionadas ao meu doutorado, pela paciência quanto às minhas solicitações, pelas oportunidades e pelo constante aprendizado.

Ao colegiado do ProAmb durante o período 2018 – 2020, em que fui representante discente, pelo aprendizado, pelo reconhecimento, por escutarem e tornarem realidade todas as minhas solicitações e sugestões para a melhoria do programa. Muito obrigada por essa oportunidade!

Ao meu querido Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental (LQTA), por ser esse laboratório tão amado por todos que trabalham aqui. Local de troca de experiências, boas ideias, pesquisa “de verdade”, ajuda mútua, trabalho em equipe e cervejas ao final do dia. Agradecimentos especiais aos verdadeiros amigos que ganhei nesse período: Andressa Rezende, Yasmim Arantes, Mariana Corrêa, Nayara Soares, Oscar Herrera e André Dias. Muito obrigada por deixarem meus dias melhores! Às minhas ICs queridas: Gabriela Barreto, Isadora Chagas e Letícia Nunes, muito obrigada por estarem sempre comigo e me darem a oportunidade de orientar vocês! Aos demais integrantes do LQTA, muito obrigada pelo respeito, por me ouvirem, por me ensinarem e por estarem sempre dispostos à vestir a camisa e trabalhar junto! Às técnicas Dra. Ananda Sanson e Natália Tanure, muito obrigada por terem tanta paciência comigo e me ajudarem sempre que preciso. Aos coordenadores do LQTA: Profs. Sérgio Aquino, Bruno Baêta, Adilson Cândido da Silva, Marcelo Rosmaninho e Mateus Amaral, por me darem a oportunidade de aprender com vocês e confiarem no meu trabalho!! Voa, LQTA!

Ao “Doctor Club” mais amado do Brasil: Yasmim Arantes, Luísa Cardoso Maia, Andressa Rezende e Grazielle Rocha, muito obrigada por estarem sempre presentes nos momentos tristes e alegres, nas frustrações e alegrias decorrentes da pesquisa, nos bares, nos congressinhos e nas viagens. Amo vocês!!

Aos meus amigos, que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial Marina Gabriela, Lorena Augusta, Paola Curi, Patrícia Mendanha Dias, Isabela Sousa e Luiza Murta, muito obrigada pela grande amizade de anos, por saberem me reconfortar com suas palavras, torcendo pelo meu crescimento pessoal e profissional, puxando a orelha quando necessário, mas sempre presentes em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada!! Amo vocês!!

Ao meu bem, Joao Victor Soares Ribeiro, por todo amor e carinho, pela paciência nos momentos estressantes, por saber me entender, confortar e acalmar durante esses 8 anos juntos. Por me encorajar, não deixando que eu desista. Por confiar em mim e me apoiar, e por dividir seus planos e sonhos comigo. Somos um só e estamos juntos. Muito obrigada, te amo!

Enfim, aos meus familiares, pelo constante e incansável incentivo, e por serem fortaleza quando eu mais precisei. Meus amados pais, Dalva e Gilmar, muito obrigada pelo incentivo, amor e compreensão. E por me ensinarem que dias difíceis vem e vão, e somos capazes de aprender e nos fortalecer em cada momento. Vocês são meus maiores exemplos de determinação e trabalho. Ao meu irmão, Álvaro, muito obrigada pelas palavras reconfortantes e pelo bom coração. Aos meus avós, Tita e Jaci, por me iluminarem daí de cima. Meu padrinho e madrinhas, Vicente, Cidinha, Salete e Roseane, muito obrigada por sempre torcerem por mim, pelas alegrias, conversas e conselhos. Amo todos vocês!

A todos, que mesmo aqui não citados, fizeram ou fazem parte desta etapa em minha vida, e torceram pelo meu sucesso pessoal e profissional.

Meus sinceros e alegres agradecimentos

“The dictionary is the only place where success comes before work”

Albert Einstein

RESUMO

PARANHOS, A. G. O. **Efeitos da tilosina na digestão anaeróbia da cama de aviário: produção e biogás e resistência a antibióticos**. 2021. 182f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2021.

Inserido em um contexto de saúde única e economia circular, o presente trabalho avalia o potencial energético da cama de aviário na produção de biogás, aliado a formas de reduzir a concentração de tilosina – um dos principais antibióticos utilizados no setor avícola – e genes de resistência antimicrobiana (GRAs) presentes nesse resíduo. Para tanto, quatro capítulos de resultados são apresentados nesta tese. No primeiro deles (capítulo 5), foram avaliados o potencial metanogênico e a viabilidade energética do uso da cama de aviário, além das influências exercidas pelo tipo de biomassa nela presente e da razão Alimento/Microrganismo (A/M) na co-digestão anaeróbia em fase sólida (SS-AD) de esterco de aves e biomassa lignocelulósica. Visto a frequente utilização de aditivos promotores de crescimento em frangos de corte, o segundo capítulo de resultados (capítulo 6), descreve o desenvolvimento e validação de um método para extração e análise de tilosina na cama de aviário por HPLC-UV e HPLC-MS/MS. Uma vez quantificada na cama de aviário, o capítulo 7 investigou a influência da concentração de tilosina na produção de metano, além de avaliar a cinética de degradação deste antibiótico, e os microrganismos envolvidos, nas principais etapas da digestão anaeróbia (hidrólise/acidogênese; acetogênese; metanogênese). Por fim, o capítulo 8 avalia o uso do pré-tratamento hidrotérmico (PTH) seguido da digestão anaeróbia, como forma de maximizar o potencial energético da cama de aviário e minimizar o teor de tilosina e GRAs presentes no resíduo. Os resultados do capítulo 5 mostram que as mais elevadas produções de metano foram obtidas na co-digestão de esterco de aves e biomassa lignocelulósica na razão A/M de 0,5 gSV. gSV⁻¹, e que o conteúdo de lignina presente na biomassa pode afetar a acessibilidade dos microrganismos à fração holocelulósica e prejudicar, indiretamente, a produção de metano. Na melhor condição avaliada, o uso de dejetos de aves em SS-AD foi capaz de suprir 53,2% da demanda térmica gasta com lenha em uma típica granja. Os dados apresentados no capítulo 6 confirmam a adequação do método analítico desenvolvido, e mostram que tilosina foi detectada em cama de aviário de galpões de recria e produção nas concentrações médias de 135 µg.kg⁻¹ e 265 µg.kg⁻¹, respectivamente. Os resultados do capítulo 7 indicam que a presença de tilosina em concentrações inferiores à 20 mg.kg⁻¹ na cama de aviário, não afetou a produção de metano em SS-AD, enquanto que a partir desse teor até 80 mg.kg⁻¹, apresentou um efeito

estimulante na produção de metano (aumento de 45,2%). A biodegradação desse antibiótico, por sua vez, foi efetivamente realizada (> 75%) em todas as etapas da digestão anaeróbia. Entretanto, a etapa metanogênica se sobressaiu e a alta taxa de degradação observada é resultado do efeito co-metabólico exercido pela adição de acetato e da atuação sintrófica entre os microrganismos envolvidos. Finalmente, o capítulo 8 mostra que, o uso do PTH à 80°C, seguido pela digestão anaeróbia em único estágio, favoreceu a produção de metano de maneira a suprir a demanda energética do pré-tratamento, e produzir um excedente de energia térmica equivalente a 33,6% da demanda térmica gasta com lenha em uma típica granja. Além disso, o processo combinado (PTH/SS-AD) foi eficiente (91,6%) na remoção de tilosina e dos GRAs *ermB*, *intI1*, *sulI* e *tetA*, presentes na cama de aviário.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana; antibiótico veterinário, sustentabilidade energética, cama de aviário, pré-tratamento hidrotérmico.

ABSTRACT

PARANHOS, A. G. O. **Efeitos da tilosina na digestão anaeróbia da cama de aviário: produção e biogás e resistência a antibióticos**. 2021. 182f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2021.

In the context of One Health and circular economy, the present work evaluates the energy potential of the poultry litter in the biogas production, combined with ways to reduce the concentration of tylosin - one of the main antibiotics used in the poultry sector - and antimicrobial resistance genes (ARGs) present in this residue. To this end, four chapters of results are presented in this thesis. In the first one (chapter 5), the methanogenic potential and energy viability of the use of poultry litter were evaluated, in addition to the influences exerted by the type of biomass present in it and the Food / Inoculum ratio (F/I) in solid stage anaerobic co-digestion (SS-AD) of poultry manure and lignocellulosic biomass. In view of the frequent use of growth-promoting additives in broilers, the second chapter of results (chapter 6), describes the development and validation of a method for extraction and analysis of tylosin in the poultry litter by HPLC-UV and HPLC-MS/MS. Once quantified in the poultry litter, chapter 7 investigated the influence of tylosin concentration on methane production, in addition to evaluating the degradation kinetics of this antibiotic, and the microorganisms involved, in the main stages of anaerobic digestion (hydrolysis/acidogenesis; acetogenesis; methanogenesis). Finally, chapter 8 assesses the use of hydrothermal pretreatment (HPT) followed by anaerobic digestion, as a way of maximizing the energy potential of the poultry litter and minimizing the content of tylosin and ARGs present in the waste. The results of chapter 5 show that the highest methane yields were obtained in the co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass in the F/I ratio of 0.5 gVS. gVS⁻¹, and that the lignin content present in the biomass can affect the accessibility of microorganisms to the holocellulosic fraction and indirectly harm methane production. In the best evaluated condition, the use of poultry manure in SS-AD was able to supply 53.2% of the thermal demand spent with firewood in a typical farm. The data presented in chapter 6 confirm the adequacy of the analytical method developed, and show that tylosin was detected in poultry litter in rearing and production sheds at the average concentrations of 135 µg.kg⁻¹ and 265 µg.kg⁻¹, respectively. The results of chapter 7 indicate that the presence of tylosin in concentrations below 20 mg.kg⁻¹ in the poultry litter, did not affect the production of methane in SS-AD, while from that content up to 80 mg.kg⁻¹, had a stimulating effect on methane production (increase of 45.2%). The biodegradation of this antibiotic, in turn, was effectively

carried out (> 75%) in all stages of anaerobic digestion. However, the methanogenic stage stood out and the high rate of degradation observed is the result of the co-metabolic effect exerted by the addition of acetate and the syntrophic action between the microorganisms involved. Finally, chapter 8 shows that the use of HPT at 80°C, followed by anaerobic digestion in a single stage, favored the production of methane in order to supply the energy demand of the pretreatment, and produce a surplus of thermal energy equivalent to 33.6% of the thermal demand spent on firewood in a typical farm. In addition, the combined process (HPT/SS-AD) was efficient (91.6%) in removing tylosin and ARGs *ermB*, *int11*, *sul1* and *tetA*, present in the poultry litter.

Keywords: Antimicrobial resistance; veterinary antibiotic; energy sustainability; poultry litter; hydrothermal pretreatment.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	23
1. Introdução	23
CAPÍTULO 2	27
2. Hipóteses e Objetivos	27
CAPÍTULO 3	28
3. Referencial Teórico	28
3.1. Antibióticos utilizados na produção animal	28
3.1.1. Produção de frango e uso da cama de aviário como fertilizante	33
3.1.2. Tilosina: antibiótico macrolídeo de uso veterinário	35
3.2. Disseminação, ocorrência e efeito dos antibióticos veterinários no ambiente	40
3.2.1. Resistência antimicrobiana associada a resíduos da produção animal	45
3.2.2. Degradação de antibióticos via digestão anaeróbia e efeito na produção de biogás	51
3.3. Referências Bibliográficas	56
CAPÍTULO 4	63
4. Justificativa da pesquisa e organização da tese	63
CAPÍTULO 5	65
5. Produção de metano pela co-digestão de esterco de aves e biomassa lignocelulósica: avaliação cinética e energética	65
5.1. Introdução	65
5.2. Materiais e Métodos	67
5.2.1. Materiais e reagentes	67
5.2.2. Caracterização dos materiais lignocelulósicos	67
5.2.3. Caracterização metagenômica do esterco de aves	68
5.2.4. Preparação do inóculo e dos substratos	69
5.2.5. Experimentos de produção de metano	69
5.2.6. Modelagem dos dados experimentais	70
5.2.7. Caracterização das frações líquidas e sólidas	71
5.2.8. Estimativa do balanço energético para a produção de metano em SS-AD	72
5.3. Resultados e Discussão	72
5.3.1. Caracterização química dos materiais lignocelulósicos, inóculo e substratos	72
5.3.2. Caracterização da comunidade bacteriana no esterco de aves	74
5.3.3. Influência da relação A/M na produção de metano por SS-AD	77

5.3.4.	Modelagem da produção de metano e influência da biomassa lignocelulósica	80
5.3.5.	Balço energético	84
5.4.	Conclusão	86
5.5.	Referências	86
5.6.	Anexos	90
CAPÍTULO 6		93
6.	Análise de tilosina em cama de aviário por HPLC-UV e HPLC-MS/MS após LTPE	93
6.1.	Introdução	93
6.2.	Materiais e Métodos	96
6.2.1.	Reagentes e Materiais	96
6.2.2.	Métodos	96
6.2.3.	Extração das amostras	97
6.2.4.	Validação da metodologia proposta	97
6.2.5.	Análise do teor de tilosina em cama de aviário proveniente de empresa avícola	102
6.3.	Resultados e Discussão	102
6.3.1.	Desenvolvimento e otimização dos métodos analíticos	102
6.3.2.	Extração de tilosina a partir das amostras de cama de aviário	104
6.3.3.	Validação dos métodos	105
6.3.4.	Análise do teor de tilosina em cama de aviário proveniente de empresa avícola	108
6.4.	Conclusão	111
6.5.	Referências	111
6.6.	Anexos	114
CAPÍTULO 7		121
7.	Tilosina em reatores anaeróbios: cinética de degradação, efeitos na produção de metano e na comunidade microbiana	121
7.1.	Introdução	121
7.2.	Materiais e Métodos	123
7.2.1.	Materiais e Produtos Químicos	123
7.2.2.	Experimentos em batelada com diferentes doses de tilosina	124
7.2.3.	Remoção de tilosina em sistemas anaeróbios	125
7.2.4.	Modelagem cinética dos dados experimentais	125
7.2.5.	Caracterização metagenômica da comunidade presente nos sistemas anaeróbios	127
7.2.6.	Procedimentos analíticos	128
7.3.	Resultados e Discussão	129
7.3.1.	Efeito da adição de tilosina em reatores anaeróbios	129

7.3.2.	Cinética de remoção de tilosina em sistemas anaeróbios	134
7.3.3.	Efeito na comunidade microbiana	140
7.4.	Conclusão	148
7.5.	Referências	148
7.6.	Anexos	153
CAPÍTULO 8		158
8.	Pré-tratamento hidrotérmico seguido de digestão anaeróbia para a remoção de tilosina e genes de resistência a antibióticos em cama de aviário	158
8.1.	Introdução	158
8.2.	Materiais e Métodos	160
8.2.1.	Materiais e Produtos Químicos	160
8.2.2.	Pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário	160
8.2.3.	Digestão anaeróbia em único (DA_1S) e duplo (DA_2S) estágios	161
8.2.4.	Análise de genes de resistência à antibióticos (GRAs)	162
8.2.5.	Procedimentos analíticos	164
8.2.6.	Balanco energético do processo	165
8.3.	Resultados e Discussão	165
8.3.1.	Influência do pré-tratamento hidrotérmico da digestão anaeróbia da cama de aviário	165
8.3.2.	Avaliação energética do uso do pré-tratamento hidrotérmico na cama de aviário	169
8.3.3.	Influência do pré-tratamento hidrotérmico e da digestão anaeróbia da cama de aviário na remoção de tilosina	171
8.3.4.	Influência do pré-tratamento e da digestão anaeróbia da cama de aviário na dinâmica de GRAs	172
8.4.	Conclusão	175
8.5.	Referências	175
8.6.	Anexos	178
CAPÍTULO 9		179
9.	Considerações finais	179
CAPÍTULO 10		180
10.	Sugestões para trabalhos futuros	180
CAPÍTULO 11		181
11.	Apêndices – Produção bibliográfica	181

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 3

Figura 3.1: Esquema representativo dos mecanismos de ação dos antibióticos na célula microbiana	29
Figura 3.2: Abates de frango de corte no Brasil	33
Figura 3.3: Principais vias de exposição aos fármacos de uso veterinário	40
Figura 3.4: Esquema comparativo da diferença entre transferência vertical e horizontal de genes	46
Figura 3.5: Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência bacteriana	47

CAPÍTULO 4

Figura 4.1: Fluxograma indicando as etapas experimentais realizadas para o cumprimento dos objetivos específicos da tese	64
--	----

CAPÍTULO 5

Figura 5.1: Abundância relativa dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes sob os níveis de classe, ordem e família	75
Figura 5.2: Produção acumulada de metano e ajuste dos modelos cinéticos para co-digestão SS-AD de esterco de aves com a) sabugo de milho (CC-PM), b) palha de arroz (RS-PM), c) serragem (SW-PM), bem como a monodigestão de esterco de aves (PM) na razão A/M de 0,5.....	81
Figura 5.3: Balanço energético utilizando sistema CHP para co-digestão SS-AD de esterco de aves com palha de arroz (RS-PM), espiga de milho (CC-PM) serragem (SW-PM) e monodigestão de esterco de aves (PM).....	85
Figura 5.1S: Produção endógena de metano pelo inóculo: 50% (em SV) esterco de aves + 50% (em SV) lodo UASB (50E 50U), 100% esterco de aves (100E) and 100% lodo UASB (100U), no pH 7, 8 e 9.....	90
Figura 5.2S: Produção acumulada de metano obtida com a co-digestão anaeróbia de diferentes substratos nas três razões A/M.....	91

CAPÍTULO 6

Figura 6.1: Estrutura química genérica da tilosina e eritromicina	95
Figura 6.2: Procedimento de extração de tilosina em amostras de esterco de aves	98
Figura 6.3: Esquema da granja avícola e unidades de coleta de resíduo	102

Figura 6.1S. Linearidade e intervalo de trabalho para o método HPLC-UV na determinação de tilosina	114
Figura 6.2S. Linearidade e intervalo de trabalho para o método HPLC-MS/MS na determinação de tilosina	114
Figura 6.3S. Gráficos dos desvios-padrão das respostas das réplicas em cada nível de concentração como função da concentração nas soluções-padrão de calibração para os métodos (a) HPLC-UV e (b) HPLC-MS/MS	115
Figura 6.4S. Cromatograma da (a) solução-padrão em 80 mg L ⁻¹ , (b) amostra branca (matriz não-fortificada) e (c) matriz fortificada em 80 µg L ⁻¹ , a partir do método HPLC-MS/MS ...	115
Figura 6.5S. Cromatograma da (a) solução-padrão em 80 µg L ⁻¹ , (b) amostra branca (matriz não-fortificada) e (c) matriz fortificada em 80 µg L ⁻¹ , a partir do método HPLC-MS/MS ...	116
Figura 6.6S: Ocorrência de efeito matriz na cama de aviário no método HPLC-MS/MS	117

CAPÍTULO 7

Figura 7.1: Produção acumulada de metano sob diferentes doses de tilosina	131
Figura 7.2: Perfil de carboidratos e ácidos graxos voláteis totais produzidos nos BMPs com diferentes dosagens de tilosina	134
Figura 7.3: Modelo cinético de primeira ordem ajustado para a remoção de tilosina e desempenho dos reatores (manutenção do pH, produção de biogás e perfil de AGVs) nas fases de hidrólise/acidogênese(a), acetogênese (b) e metanogênese (c)	136
Figura 7.4: Abundância relativa a nível de reino para os ensaios em sistemas anaeróbios referentes às três fases (AC, AT e M) nos tempos 0h, 96h e 288h	142
Fig. 7.5: Distribuição de gêneros com abundância relativa > 1% para os ensaios em sistemas anaeróbios referentes às três fases (AC, AT e M) nos tempos 0h, 96h e 288h	147

CAPÍTULO 8

Figura 8.1: Produção acumulada de metano da cama de aviário <i>in natura</i> e submetida ao PTH, em único e duplo estágios	167
Figura 8.2: Balanço energético utilizando o sistema CHP para a digestão anaeróbia em único e duplo estágios da cama de aviário (CA) com e sem pré-tratamento hidrotérmico (PTH)	170
Figura 8.3: Mudanças no teor de tilosina após a digestão anaeróbia (DA) da cama de aviário, após o pré-tratamento hidrotérmico (PTH) e após o processo combinado (PTH + DA)	171
Figura 8.4: Heatmap mostrando a dinâmica da abundância absoluta de RNAr, IntI1 e GRAs durante o processo experimental envolvendo o pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário seguido pela digestão anaeróbia	174

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1: Antimicrobianos promotores de crescimento em animais e legislação nacional correspondente ao seu uso	32
Tabela 3.2: Ranking dos principais municípios mineiros com maiores plantéis em 2019	34
Tabela 3.3: Propriedades físico-químicas da substância tilosina	36
Tabela 3.4: Faixas de ocorrência de alguns antibióticos veterinários encontrados em amostras ambientais	43
Tabela 3.5: Principais genes de resistência a antibióticos e seus mecanismos de ação	49
Tabela 3.6: Ocorrência de genes de resistência a antibióticos em amostras de dejetos avícolas	50
Tabela 3.7: Efeito de antibióticos na produção de metano na digestão anaeróbia de dejetos animais em diferentes sistemas de tratamento	54

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1: Caracterização das biomassas lignocelulósicas	73
Tabela 5.2: Caracterização do inóculo e substratos usados na co-digestão	74
Tabela 5.3: Desempenho dos reatores anaeróbios ao final da co-digestão de biomassa lignocelulósica e esterco de aves	79
Tabela 5.4: Parâmetros cinéticos dos modelos de Gompertz e Groot para a produção de metano em SS-AD nas melhores condições	83
Tabela 5.1S: Acúmulo de AGVs observados no final dos testes SS-AD	92

CAPÍTULO 6

Tabela 6.1: Parâmetros cromatográficos otimizados para os métodos analíticos testados para a análise de tilosina em cama de aviário	104
Tabela 6.2: Faixa de trabalho e coeficiente de variação (CV), para seis réplicas em cada nível, para a análise de tilosina em cama de aviário	105
Tabela 6.3: Recuperações de tilosina na cama de aviário (%), com o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (CV) para seis réplicas em cada nível	108
Tabela 6.4: Teores de tilosina encontrados nas amostras das fases recria e produção para 10 réplicas	109
Tabela 6.5: Diferentes métodos reportados na literatura para a quantificação de tilosina em solos e amostras de esterco	110

Tabela 6.1S. Eficiência de recuperação de tilosina (%) para a cama de aviário como função do conteúdo de sal adicionado	118
Tabela 6.2S. Parâmetros usados para calcular os limites de detecção e quantificação de tilosina nos métodos HPLC-UV e HPLC-MS/MS	118
Tabela 6.3S. Precisão intermediária da quantificação de tilosina em cama de aviário pelos métodos HPLC-UV e HPLC-MS / MS	119
Tabela 6.4S. Resultados do estudo da robustez para a quantificação de tilosina em cama de aviário pelo método HPLC-UV	120
Tabela 6.5S. Resultados do estudo de robustez para a quantificação de tilosina em cama de aviário no método HPLC-MS/MS	120

CAPÍTULO 7

Tabela 7.1: Concentração residual de tilosina e parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir da produção acumulada de metano nos ensaios em batelada	133
Tabela 7.2: Parâmetros obtidos a partir dos modelos cinéticos de primeira ordem e de primeira ordem ajustado para a remoção da tilosina nas três etapas da digestão anaeróbia (hidrólise, acetogênese e metanogênese)	138
Tabela 7.3: Total de sequências observadas, índice estimador de riqueza e índice de diversidade para os ensaios em sistemas anaeróbios referentes às três fases (AC - acidogênese, AT - acetogênese e M - metanogênese) nos tempos 0h, 96h e 288h	141
Tabela 7.1S: Detalhamento do método analítico desenvolvido para quantificação de tilosina em reatores anaeróbios	153
Tabela 7.2S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de BMP com dosagens de tilosina	154
Tabela 7.3S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de cinética da fase hidrolítica/acidogênica	155
Tabela 7.4S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de cinética da fase acetogênica	156
Tabela 7.5S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de cinética da fase metanogênica	157

CAPÍTULO 8

Tabela 8.1: Primers utilizados na quantificação de GRAs em amostras de cama de aviário in natura, pré-tratadas e digeridas anaerobicamente	163
Tabela 8.2: Caracterização físico-química das amostras de cama de aviário in natura e após os pré-tratamentos à 80°C e 98°C	166

Tabela 8.3: Desempenho dos reatores e parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir da produção acumulada de metano	168
Tabela 8.4: Log da abundância relativa dos genes investigados no processo experimental envolvendo o pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário seguido pela digestão anaeróbia	174
Tabela 8.1S: AGVs produzidos durante o processo PTH + DA da cama de aviário	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGVs – Ácidos Graxos Voláteis

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AV – Antibiótico veterinário

AVI – Avilamicina

BAC – Bacitracina

BMP – *Biochemical Methane Potential*

BRA – Bactéria resistentes à antibióticos

CFZ – Cefazolina

CFC – Cloranfenicol

CHP – *Combined Heat & Power*

CIP – Ciprofloxacina

CTC – Clortetraciclina

DA – Digestão anaeróbia

DA_1S – Digestão anaeróbia em único estágio

DA_2S – Digestão anaeróbia em duplo estágio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ENO – Enrofloxacina

ENR – Enramicina

ERY – Eritromicina

FF – Furfuraldeído

GRA – Gene de resistência à antibióticos

HMF – 5-Hidroximetilfurfural

HPLC – *High Performance Liquid Chromatograph*

LD – Limite de Detecção

LIN – Lincomicina

LQ – Limite de Quantificação

LTPE – *Low Temperature Partitioning Extraction*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS – *Mass Spectrometer*

NOR – Norfloxacin
NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
OFL – Ofloxacin
OMS – Organização Mundial da Saúde
OTC – Oxitetraciclina
OTU – *Operational Taxonomic Unit*
UV – Ultravioleta
PNC – Penicilina
PTH – Pré-tratamento Hidrotérmico
RID – *Refractive Index Detector*
SM2 – Sulfadimidina
SMD – Sulfametoxidiazina
SMZ – Sulfametazina
SMX – Sulfametoxazole
SS-AD – *Solid Stage Anaerobic Digestion*
STZ – Sulfatiazole
ST – Sólidos Totais
SV – Sólidos Voláteis
TC – Tetraciclina
TCO – Taxa de Carreamento Orgânico
TDH – Tempo de Detenção Hidráulica
TMP – Trimetropina
TYL – Tilosina
UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*
VIR – Virginiamicina

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil vem se destacando na produção e exportação de carne. Em 2019, o país alcançou a primeira posição no ranking das exportações de carne de frango e a quarta posição na exportação de carne suína, além de ser o segundo maior produtor de carne bovina (EMBRAPA, 2019). No mesmo ano, destacou-se a produção brasileira de carne de frango, totalizando 13,64 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2019). Isso é resultado, principalmente, da mudança de hábito de consumo de carne do brasileiro, que deixou de ser um país essencialmente consumidor de carne bovina e passou a ser consumidor de carne de frango, apresentando um consumo equivalente a 45,00 kg.hab⁻¹.ano⁻¹, no ano de 2020 (ABPA, 2021). Em relação aos atrativos para o consumo dessa carne, salienta-se que a carne de frango não possui restrições religiosas, como a carne de porco por exemplo, na qual o consumo é condenado pelo Islamismo, Judaísmo e pelos Adventistas do Sétimo Dia. Além disso, ressalta-se o menor preço em relação à outras carnes. Segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA), em março de 2021, o quilo do frango limpo custava em média R\$ 8,47, enquanto a carne bovina custava em média R\$ 36,31/kg.

Como forma de assegurar a qualidade e competitividade de seus produtos, bem como atender a expectativa do mercado brasileiro, os produtores de animais investem, cada vez mais, em medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia, como os antibióticos e antimicrobianos. Segundo levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS), foram consumidas 2.225,47 toneladas de antibióticos veterinários no Brasil em 2016, o maior consumo em um ranking de 65 países desenvolvidos e subdesenvolvidos. No mesmo ano, os antibióticos mais consumidos no país foram os pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, como a penicilina, seguidos dos macrolídeos, quinolonas e tetraciclina. Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), entre 2010 e 2015, as tetraciclina e os macrolídeos foram os antibióticos mais utilizados para a criação de animais nos países americanos.

Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autoriza o uso de 12 compostos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais de uso comum para diversas espécies animais, como bovinos, suínos e aves (MAPA, 2020). A tilosina, até o ano de 2018, era um dos antibióticos macrolídeos mais amplamente consumidos como promotores de crescimento na fase final de desenvolvimento dos frangos. A substância auxilia no tratamento de enterite necrótica, causada por *Clostridium perfringens*, e no tratamento e prevenção de doenças respiratórias crônicas, causadas *Mycoplasma*

gallisepticum e *Mycoplasma synoviae*, em frangos e perus de corte (MAM, 2014). Entretanto, classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) como “antimicrobiano criticamente importante de prioridade máxima”, devido à sua semelhança estrutural com o antibiótico de uso humano eritromicina e a verificação de resistência cruzada entre as duas substâncias, a tilosina entrou na lista dos antimicrobianos indicados para proibição segundo a Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018, quanto ao seu uso, e de outros antimicrobianos, como aditivos promotores de crescimento em animais (MAPA, 2018). Recentemente publicada, a Instrução Normativa SDA nº 01, de 13 de janeiro de 2020, finalmente proibiu o uso de tilosina, lincomicina e tiamulina como aditivos melhorados de desempenho em animais, sendo ainda permitido o uso dessas substâncias para fins terapêuticos (MAPA, 2020).

Não obstante, uma vez inseridos no organismo animal via alimentação, a tilosina e muitos outros antibióticos não são totalmente metabolizados, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizada (Sarmah, Meyer e Boxall 2006). Assim, a utilização da cama de aviário – principal resíduo gerado na avicultura - em áreas usadas pela agricultura, seguido pelo escoamento superficial, constitui uma das principais vias de entrada desses compostos no ambiente terrestre e aquático (Kemper 2008). Diversos estudos recentes sobre o tema, tem detectado a presença dessas substâncias, em baixas concentrações (ng.L^{-1} a mg.L^{-1}), em diferentes amostras ambientais, como água, solo, sedimentos e excreta de animais (Leal et al. 2012; Martínez-Carballo et al. 2007; Ok et al. 2011; Pinheiro et al. 2013; Zhao, Dong, and Wang 2010).

Entretanto, apesar da significativa ocorrência de compostos antibióticos no ambiente, sabe-se que a real fonte de resistência antimicrobiana não é a presença dos princípios ativos em si, mas o aporte de bactérias já resistentes, veiculadas por meio de águas residuárias e esterco, selecionadas em organismos durante o tratamento terapêutico com antibióticos (Kümmerer, 2009). A resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública, uma vez que, o aumento de cepas resistentes e a possibilidade de contaminação cruzada tem tornado o tratamento de patologias humanas cada vez menos eficiente e mais preocupante.

Preliminarmente à sua disposição ao meio ambiente, os dejetos animais são submetidos a uma variedade de práticas de manejo, incluindo armazenamento em poço ou em pilhas, compostagem, digestão anaeróbia ou degradação em lagoas aeradas (Mitchell et al., 2013). A digestão anaeróbia (AD) tem se mostrado um método promissor e eficiente na estabilização da matéria orgânica presente em dejetos animais, bem como na redução de odores e patógenos

(Mitchell et al., 2013), além de permitir a produção de biogás rico em metano (CH_4), que pode ser usado para gerar eletricidade, calor ou combustível comprimido para transporte (US EPA, 2006). A digestão anaeróbia da cama de aviário, em particular, controlaria o problema da emissão não controlada de gases estufa (CH_4 , NO_x , etc), ao mesmo tempo em que o metano produzido poderia ser empregado na própria planta, para geração de energias elétrica e/ou térmica que seria uma forma mais sustentável para o aquecimento dos galpões de criação, substituindo a queima da lenha, por exemplo (Marchioro et al., 2018).

A potencial aplicação da cama de aviário *in natura* em sistemas anaeróbios já foi relatada por diversos autores (Costa et al., 2012; Rajagopal & Massé, 2016; Shen & Zhu, 2017), e outros, inclusive, mostraram os efeitos do tratamento anaeróbio na redução de bactérias (BRAs) e genes (GRAs) de resistência a antibióticos em resíduos agropecuários (Anjum, Grohmann & Krakat, 2017; Luo et al., 2017). Por outro lado, muitos estudos mostram que o teor de antibióticos presentes nos resíduos animais pode afetar a eficiência dos biodigestores utilizados no tratamento desses rejeitos (Beneragama et al., 2013; Ince et al., 2013; Shi et al., 2011).

A utilização de diferentes tecnologias de pré-tratamento nos dejetos animais, previamente à DA, vem crescendo como alternativa potencial para melhorar a biodegradabilidade do substrato, a degradação de compostos orgânicos recalcitrantes e o aumento da eficiência dos reatores anaeróbios em relação à produção de biogás (Zhang et al., 2017). Nesse sentido, o pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do resíduo, ou hidrólise térmica, se destaca por apresentar a melhor eficiência de remoção de agentes de resistência antimicrobiana (Pei et al., 2016; Yang et al., 2020). Além de que, em condições adequadas, o PTH pode garantir uma melhor integração energética na planta, uma vez que o aumento da disponibilidade de matéria orgânica para os microrganismos anaeróbios, via rompimento e desconstrução celular, propicia aumento na produção de metano no processo de DA subsequente (Pei et al., 2016).

Entretanto, o efeito do pré-tratamento hidrotérmico aplicado à cama de aviário na redução de seletores de resistência antimicrobiana (antibióticos, BRAs e GRAs) e na potencialização da produção de biogás a partir desse resíduo, em sistemas biológicos de tratamento, ainda não foi estudado. Além disso, a interligação entre os parâmetros operacionais dos reatores biológicos e os processos do metabolismo microbiano que ocasionam a degradação de fármacos, constitui-se de um grande desafio, o qual possibilita o controle de engenharia sobre o processo e permite otimizar as condições de maior remoção.

Dessa forma, a presente tese de doutorado aborda três questões interligadas, a saber: i) avaliar a produção de metano na digestão anaeróbia de cama de aviário *in natura* e submetida ao pré-tratamento hidrotérmico; ii) investigar a influência, cinética e possíveis rotas de degradação de tilosina em sistemas anaeróbios; iii) avaliar a dinâmica de seletores de resistência antimicrobiana (antibióticos, bactérias e genes) durante o pré-tratamento hidrotérmico e digestão anaeróbia da cama de aviário.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Geral	O tratamento anaeróbio da cama de aviário possibilita a geração de biogás de forma econômica e ambientalmente viável e reduz os seletores de resistência antimicrobiana (antibióticos, GRAs e BRAs) presentes no resíduo.		
Hipótese A	<p style="text-align: center;">Hipótese</p> <p>A cama de aviário é um resíduo com alto conteúdo orgânico e nutricional que pode ser utilizado de forma economicamente viável para a produção de metano via digestão anaeróbia em fase sólida.</p>	<p style="text-align: center;">Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Avaliar o efeito exercido pelos principais materiais lignocelulósicos utilizados como cama, na digestão anaeróbia do resíduo avícola; - Avaliar o efeito da relação Alimento/Microrganismo na digestão anaeróbia em fase sólida da cama de aviário; - Investigar as condições que tornam energeticamente viável a utilização da cama de aviário para a digestão anaeróbia em fase sólida. 	<p>Capítulo de avaliação da hipótese</p> <p>Capítulo 5</p>
Hipótese B	<p>Elevadas concentrações de tilosina na cama de aviário, como é de se esperar durante o tratamento terapêutico, contribui negativamente para a produção de metano a partir desse resíduo, em decorrência da inibição dos microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Desenvolver método analítico para a detecção e quantificação de tilosina em cama de aviário; - Avaliar o efeito da concentração de tilosina na produção de metano em sistemas anaeróbios de único estágio; - Investigar a cinética de degradação de tilosina nas principais etapas da digestão anaeróbia (hidrólise/acidogênese, acetogênese e metanogênese). 	<p>Capítulo 6</p> <p>Capítulo 7</p>
Hipótese C	<p>O pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário, além de contribuir de forma energeticamente sustentável para aumentar a produção de biogás, leva à remoção dos agentes de resistência antimicrobiana presentes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Avaliar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário na produção de metano, em sistemas anaeróbios de único e duplo estágios; - Avaliar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico e da digestão anaeróbia, quando isolados ou combinados, na degradação de tilosina, BRAs e GRAs; - Avaliar a viabilidade energética do aproveitamento do biogás gerado, nos diferentes cenários testados – resíduo <i>in natura</i> ou pré-tratado e, digestão em único ou duplo estágio - via simulação do ciclo CHP (<i>combined heat and power cycle</i>). 	<p>Capítulo 8</p>

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Antibióticos utilizados na produção animal

Segundo a Instrução Normativa nº 26, de 9 de Julho de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), antibiótico é definido como substância química produzida ou derivada de microrganismos que, em baixa concentração, inviabiliza ou inibe o crescimento de microrganismos causadores de doenças. Antimicrobiano, por sua vez, é qualquer substância que, em baixa concentração, exerce toxicidade seletiva contra microrganismos.

A classificação dos antibióticos baseia-se em seu mecanismo de ação. Assim, são descritos cinco mecanismos de ação, tal como representado na Figura 3.1. Os antibióticos que inibem a síntese da parede celular possuem ação na síntese do peptidoglicano – principal constituinte da parede celular – e são denominados de β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems), bacitracinas e/ou glicopeptídeos (avoparcina, vancomicina). Outros antibióticos conseguem desorganizar a membrana citoplasmática, e afetar sua função, podendo ser cátions, ânions ou agentes neutros. Exemplos de antibióticos com esse mecanismo de ação são as polimixinas e a daptomicina. Existem antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomos, agindo na subunidade 30s, como é o caso dos aminoglicosídeos e das tetraciclina, ou na subunidade 50s, como é o caso dos macrolídeos, anfenicóis e lincosamidas. Os antibióticos que interferem na síntese dos ácidos nucleicos são as fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina) e a rifampicina. Por fim, existem antibióticos capazes de alterar os mecanismos celulares, mais especificamente a síntese do ácido fólico, como é o caso das sulfonamidas (sulfametazina, sulfametoxazole, sulfatiazina, sulfadimidina) e da associação de sulfametoxazole e trimetropina (ANVISA, 2019).

A principal utilização dessas substâncias para os animais é a terapêutica, fundamentada sobre a capacidade das mesmas em controlar a proliferação de microrganismos patógenos associados com prejuízos à saúde animal. Entre essas características, destacam-se o seu amplo espectro de ação, seu alto índice terapêutico e sua tendência à inocuidade frente às defesas naturais do organismo (Spinoza, Górnaiak, and Bernardi, 2006).

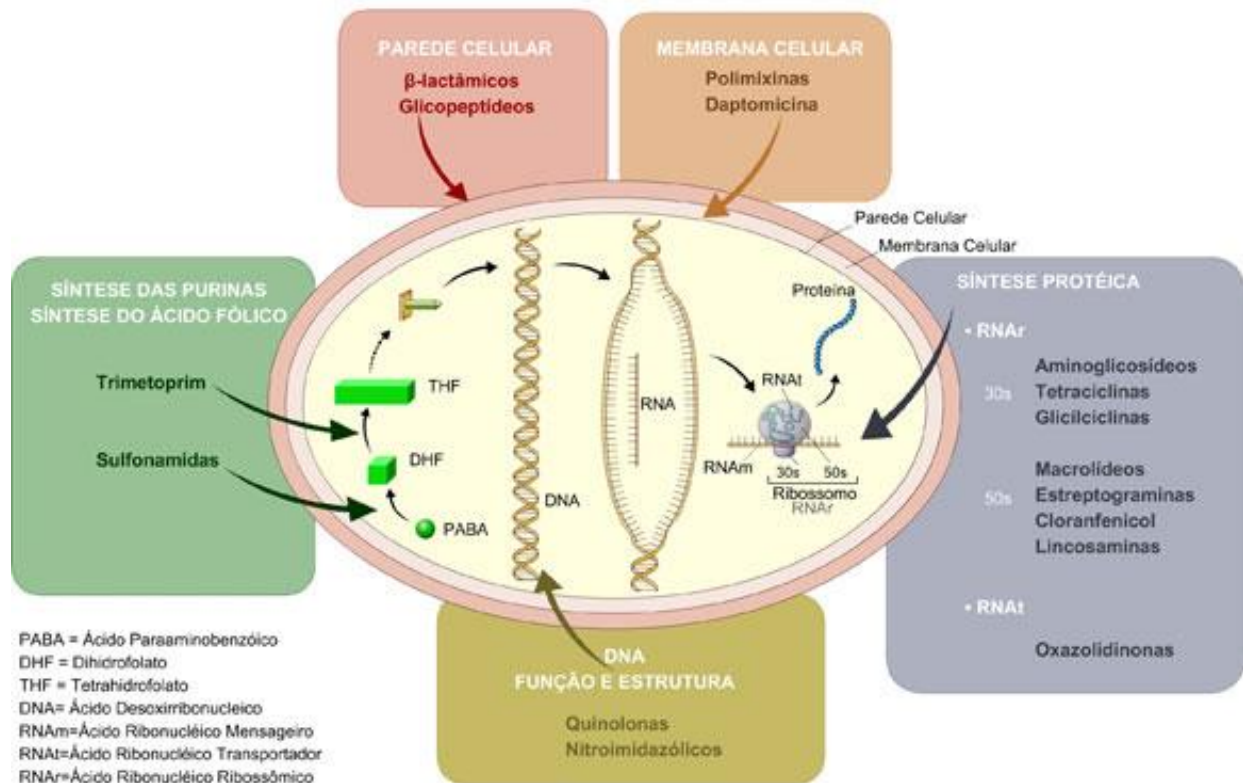


Figura 3.1: Esquema representativo dos mecanismos de ação dos antibióticos na célula microbiana.

Fonte: ANVISA, 2019.

Entretanto, os antibióticos estão sendo extensivamente utilizados como aditivos que, quando incorporados à ração, melhoram o desempenho zootécnico e reduzem a mortalidade do rebanho, funcionando assim como promotores do crescimento animal (Menten, 2001). O fator que determina qual a ação da substância no organismo é a dosagem. Dessa forma, para um antibiótico funcionar como promotor de crescimento, este deve ser incorporado como ingrediente à ração em subdosagens capazes de efetivamente melhorar a produtividade (Salyers, 1999).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO/WHO - Food and Agriculture Organization / World Health Organization), aditivos promotores de crescimento são substâncias não nutrientes que, incorporadas às rações dos animais, visam o aumento na produtividade e impedimento da deterioração da ração (Palermo-Neto et al., 2006). Como promotores, os antibióticos podem ser utilizados para todas as categorias da produção animal, tendo como funções aumentar a produtividade, diminuir a mortalidade, prevenir infecções e impedir a deterioração da própria ração (Palermo-Neto et al., 2006), pois seu mecanismo de ação está relacionado com a diminuição do número de bactérias patogênicas no lúmen intestinal,

reduzindo o *turnover* celular da superfície dos enterócitos, favorecendo assim, a maior digestibilidade e absorção de aminoácidos (Rutz e Lima, 2001).

Barcellos, Razia e Borowski (2003) avaliaram a ocorrência de infecções entéricas causadas por bactérias em 38 rebanhos suínos e constataram que nas granjas que mantinham o uso de antimicrobianos na ração, em doses de promotores de crescimento, a ocorrência de diarreia era esporádica e os sintomas tendiam a ser leves, consistindo principalmente de fezes amolecidas sem outros sinais clínicos simultâneos. Já a maioria dos rebanhos não medicados apresentava uma forma mais severa de diarreia.

O efeito do aumento de produtividade esperado pelo uso dos promotores de crescimento traduz-se por melhorias no ganho de peso; diminuição do tempo necessário para que se atinja o peso ideal para o abate (tempo de engorda); diminuição da quantidade de alimento consumido pelo animal até o momento do abate (aumento da eficiência alimentar); melhora nas qualidades organolépticas, de textura e diminuição do teor de gordura nas carcaças; prevenção de patologias infecciosas ou parasitárias; e diminuição da mortalidade (Palermo-Neto et al., 2006).

O consumo global de antimicrobianos na produção de alimentos para animais foi estimado em 63151 (\pm 1560) toneladas em 2010 e prevê-se um aumento de 67%, para 105596 (\pm 3605) toneladas, até 2030. Dois terços (66%) do aumento global (67%) do consumo de antibióticos é devido ao número crescente de animais criados para a produção de alimentos. O terço restante (34%) é imputável a uma mudança nas práticas agrícolas, com uma proporção maior de animais projetados para serem criados em sistema de agropecuária intensiva até 2030 (van Boeckel et al., 2015).

Em 2010, os cinco países com a maior participação no consumo global de antimicrobianos na produção de alimentos para animais foram China (23%), EUA (13%), Brasil (9%), Índia (3%) e Alemanha (3%). Em 2030, esse ranking está projetado para ser China (30%), EUA (10%), Brasil (8%), Índia (4%) e México (2%) (Van Boeckel et al., 2015). Atualmente, China e Brasil estão entre os maiores consumidores de antimicrobianos, visto a elevada produção de proteína animal por esses países, entretanto não são países com o mais rápido aumento projetado para o consumo de antimicrobianos. Isso indica que esses dois países já iniciaram uma mudança em direção a sistemas de produção agropecuária mais intensificados, usando antimicrobianos apenas para manter a saúde animal e aumentar a produtividade (Van Boeckel et al., 2015).

De fato, o MAPA, desde 1992, tem realizado medidas no sentido de controlar o uso indiscriminado de antimicrobianos em animais, proibindo, por exemplo, a utilização de alguns

antibióticos, como os anfenicóis, tetraciclinas, penicilinas, β -lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (Portaria Ministerial nº 193, 12/05/1998, revogada pela Instrução Normativa nº 26, 09/07/2009), avoparcina (Ofício Circular DFPA nº 47, 16/10/1998), além do cloranfenicol e nitrofuranos (Instrução Normativa MAPA nº 9, 27/06/2003), o olaquinox (IN MAPA nº 11, 24/11/2004), o carbadox (IN MAPA nº 35, 14/11/2005), a espiramicina e eritromicina (IN MAPA nº 14, 17/05/2012) e o sulfato de colistina (IN MAPA nº 45, 28/11/2016). No final de 2018, o MAPA publicou a Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018, que informa sobre a intenção de proibição de uso dos antimicrobianos – tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina – com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos. Recentemente, a Instrução Normativa que proíbe a utilização dos antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina, como aditivos promotores de crescimento (IN SDA nº 01, de 13 de janeiro de 2020) foi publicada, com atuação a partir da data de publicação da portaria. A Tabela 3.1 descreve os antibióticos atualmente proibidos e sua legislação correspondente, bem como aqueles que ainda são permitidos para utilização como aditivos promotores de crescimento em animais.

Conforme Regimento Interno da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), publicado pela Portaria MAPA nº 45/07, as atividades regulatórias de normatização e fiscalização relacionadas aos aditivos para alimentação animal, são de competência da Divisão de Fiscalização de Aditivos (DFA), da Coordenação de Fiscalização de Produtos para Alimentação Animal (CPAA). Entretanto, apesar de todas as medidas legislativas para garantir o uso prudente de antimicrobianos na alimentação animal, o uso indiscriminado desses fármacos ainda é recorrente, uma vez que ainda não são necessárias prescrições veterinárias para a compra desses medicamentos. Dessa forma, uma vez inseridos no organismo animal, essas substâncias são excretadas na forma metabolizada ou original e podem ocasionar uma série de problemas toxicológicos e ambientais, bem como prejudicar a produção de biogás em empresas que aplicam os dejetos animais em biodigestores para geração de energia.

Tabela 3.1: Antimicrobianos promotores de crescimento em animais e legislação nacional correspondente ao seu uso.

Antibiótico	Grupo	Legislação pertinente
Avilamicina	Suínos e aves	Permitido
Bacitracina de Zinco	Suíno, aves e bovinos	Permitido - Port nº 171, 13/12/2018
Bacitracina Metileno Disalicilicato	Suínos e aves	Permitido - Port nº 171, 13/12/2018
Carbadox	Suínos	Proibido - IN nº 35, 14/11/2005
Ceftiofur	Suínos	Proibido - IN nº 26, 09/07/2009
Clorexidina	Suínos e aves	Permitido - Port SDA nº 428/2009
Diidroestreptomicina	Suíno, galinhas e bovinos	Proibido - IN nº 26, 09/07/2009
Enramicina	Suínos e aves	Permitido
Eritromicina	Suíno, aves e peixes	Proibido - IN nº 14, 17/05/2012
Espiramicina	Suíno, aves e bovinos	Proibido - IN nº 14, 17/05/2012
Flavomicina	Suíno, aves e peixes	Permitido
Florfenicol	Suínos	Proibido - IN nº 9, 27/06/2003
Halquinol	Suínos e aves	Permitido - Port SDA nº 428/2009
Lasalocina	Bovinos	Permitido
Lincomicina	Suíno, aves e peixes	Proibido - IN nº 01, 13/01/2020
Maduramicina	Aves	Permitido
Monensina	Bovinos	Permitido
Nitrovin	Suínos, galinhas e bovinos	Proibido - IN nº 9, 27/06/2003
Olanquinox	Suínos, galinhas e bovinos	Proibido - IN nº 11, 24/11/2004
Penicilina	Suínos, bovinos, caprinos, ovelhas	Proibido - IN nº 26, 09/07/2009
Salinomicina	Suínos e aves	Permitido
Spectromicina	Suíno, galinha, bovino e peixes	Proibido - IN nº 26, 09/07/2009
Sulfato de Colistina	Suínos, aves e bovinos	Proibido - IN nº 45, 28/11/2016
Tiamulina	Suíno, galinhas e bovinos	Proibido - IN nº 01, 13/01/2020
Tilosina	Suíno, aves e peixes	Proibido - IN nº 01, 13/01/2020
Virginiamicina	Suíno, galinhas e bovinos	Permitido - Port nº 171, 13/12/2018

Fonte: MAPA, 2021

3.1.1. Produção de frango e uso da cama de aviário como fertilizante

Em 2019, o Brasil se destacou na produção e exportação de carne, o que fez com que o país alcançasse a primeira posição no ranking das exportações de carne de frango e a quarta posição na exportação de carne suína, além de ser o segundo maior produtor de carne bovina no mesmo ano (EMBRAPA, 2020). Esse destaque também pode ser observado em relação ao número de animais abatidos, ficando a região Sul em 1º lugar (~ 8 mil ton) e a região Sudeste em 2º (~ 2,8 mil ton), totalizando cerca de 13,6 mil toneladas de animais abatidos no país em 2019 (Figura 3.2). Essa taxa de produção elevada deve-se à mudança de hábito de consumo de carne dos brasileiros e o volume de exportações. O Brasil passou de um país preponderantemente consumidor de carne bovina para consumidor de carne de frango, melhorando assim a qualidade do produto a preços mais acessíveis (EMBRAPA, 2020).

ABATE DE FRANGOS NO BRASIL - 2019

*Em mil toneladas e variação entre 2000 e 2019, por regiões
*Fonte: IBGE

Embrapa

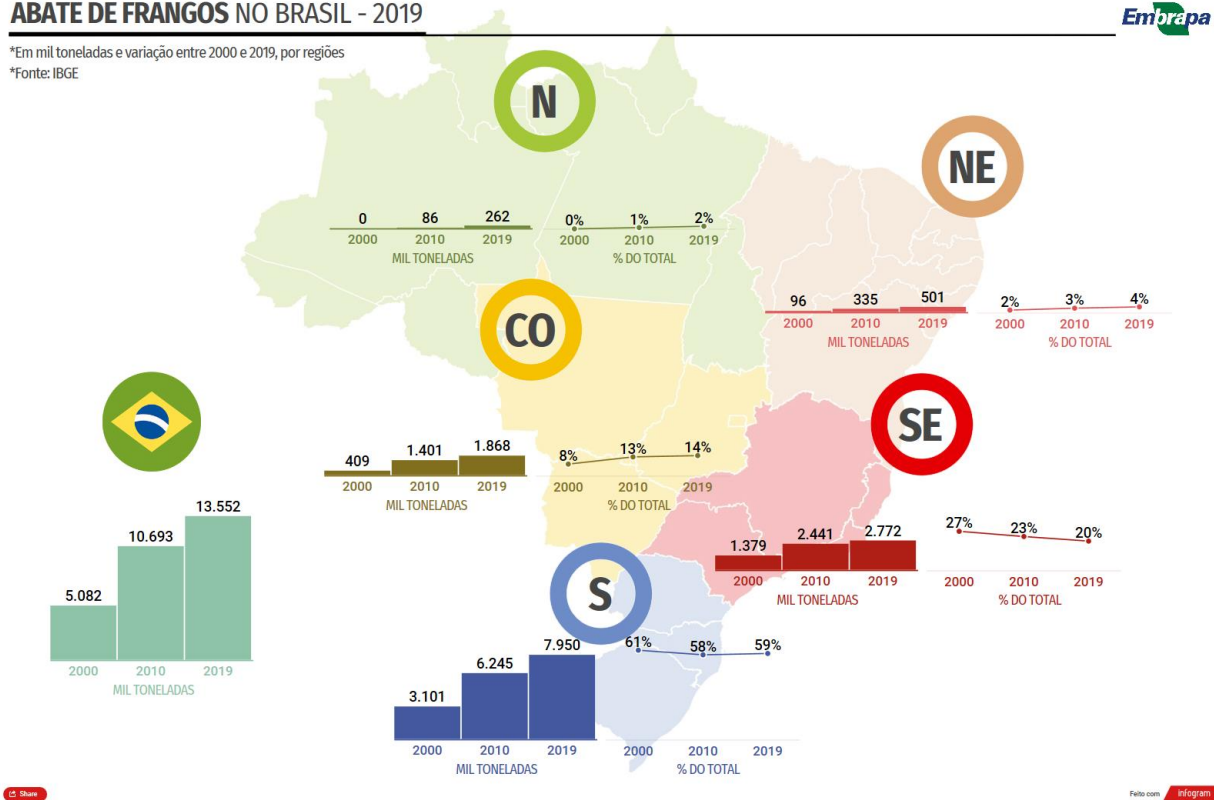


Figura 3.2: Abates de frango de corte no Brasil. Fonte: EMBRAPA, 2021.

Minas Gerais, por sua vez, se encontra em 5º lugar no ranking, com uma produção de 119.613.000 cabeças em 2019, representando uma participação equivalente a 8,2% (SEAPA, 2020). As regiões Central (27%), Triângulo Mineiro (19%), Centro-Oeste (19%) e Sul (15%) são

as principais regiões produtoras de frango de corte no estado e, juntas, representam 80% da produção estadual. São Sebastião do Oeste, localizada no Centro-Oeste mineiro e sede da granja que cedeu o resíduo a ser estudado nessa pesquisa, é a cidade com a 3ª maior produção de frangos no Estado, totalizando 7,1 milhões de cabeças em 2019 (SEAPA, 2020), atrás apenas de Uberlândia e Pará de Minas. A produção de frango de corte nas 10 principais cidades de Minas Gerais é mostrada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Ranking dos principais municípios mineiros com maiores plantéis em 2019.

Ranking	Município	Região agrícola	Frangos (milhões de cabeças)
1º	Uberlândia	Triângulo	12,0
2º	Pará de Minas	Central	7,5
3º	São Sebastião do Oeste	Centro-Oeste de Minas	7,1
4º	São José da Varginha	Central	4,4
5º	Pitangui	Central	4,2
6º	Itanhandu	Sul de Minas	3,6
7º	Barbacena	Central	3,4
8º	Uberaba	Triângulo	3,1
9º	Montes Claros	Norte de Minas	2,9
10º	Monte Alegre de Minas	Triângulo	2,9

Fonte: SEAPA (2020)

A cama de aviário é o principal subproduto da criação de frango de corte. Esse resíduo é composto por uma mistura de excrementos animais, material da cama (por exemplo, aparas de madeira, palhas ou cascas de grãos), restos de ração, aves mortas, ovos quebrados e penas removidas. Tem como principal função o isolamento térmico entre o piso e as patas das aves, além da diminuição da umidade, conforto das aves e manutenção de microrganismos que equilibram o ambiente protegendo-o contra enfermidades (Kelleher et al., 2002).

Esse resíduo, por sua vez, foi comumente utilizado para alimentação de ruminantes. Entretanto, essa prática foi proibida no Brasil, desde 2004 (IN nº 08, de 25/03/2004) devido à possibilidade de ocorrência da “doença da vaca louca” – Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) – nos bovinos e até mesmo no homem, afetando o sistema nervoso, causando mudança no comportamento, paralisia e morte. Essa doença é causada por uma proteína infectante denominada *prion*. Sua principal forma de transmissão é por alimentos contendo algumas proteínas e gorduras de origem animal (como farinha de carne e ossos) procedentes de animais doentes (MAPA, 2017).

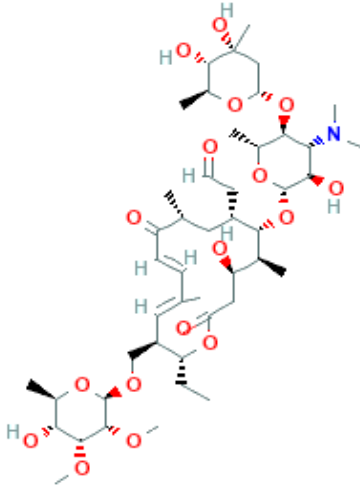
Dessa forma, a cama de aviário passou a ser utilizada como fertilizante orgânico devido ao alto conteúdo nutricional, como nitrogênio, fósforo e potássio (Kelleher et al. 2002). Por outro lado, o elevado conteúdo orgânico desse material leva à emissões não controladas de gás estufa, principalmente metano, devido à sua decomposição anaeróbia nos solos onde é aplicado. Dessa forma, uma possível alternativa é a utilização desse resíduo como matéria-prima para a produção de energia (biogás) anterior à sua aplicação no solo para a ciclagem de nutrientes, visto o elevado conteúdo orgânico do dejetos avícola associado ao material lignocelulósico da cama (Costa et al., 2012). No caso do material lignocelulósico, especificamente, para que haja o aproveitamento máximo do conteúdo energético, o material deve passar por algum tipo de pré-tratamento, sendo ele físico, químico ou térmico, de forma a desconstruir a biomassa lignocelulósica e tornar os seus constituintes mais acessíveis ao ataque de microrganismos anaeróbios (Baêta et al., 2016).

Ademais, a aplicação da cama de aviário em solos agrícolas pode levar a um enriquecimento de nutrientes na água, resultando na eutrofização dos corpos d'água, devido ao escoamento superficial, além de disseminação de patógenos e da produção de substâncias fitotóxicas (Kelleher et al. 2002). Não obstante, essa prática de manejo também é uma via de entrada dos antibióticos veterinários (AVs) no ambiente, utilizados para fins terapêuticos ou como promotores de crescimento (Kemper, 2008). No solo, especificamente, a atividade dos AVs ainda não é totalmente compreendida, no entanto, as avaliações de risco ambiental desses antibióticos consideram a persistência e a adsorção de tais compostos para estimar seu destino e atividade no meio ambiente (Kumar, Lee, and Cho, 2012).

3.1.2. Tilosina: antibiótico macrolídeo de uso veterinário

A tilosina ($C_{46}H_{77}NO_{17}$) é um antibiótico macrolídeo de amplo espectro, de massa molecular $916,1 \text{ g.mol}^{-1}$ que apresenta atividade contra a maioria das bactérias gram-positivas e diferentes membros de *Mycoplasma spp.* Mostra-se ativo também contra alguns micro-organismos gram-negativos e membros do grupo *Chlamydia spp.*, sem, entretanto, apresentar atividade contra bactérias da família Enterobacteriaceae. Do ponto de vista farmacocinético, a tilosina é classificada como uma base orgânica fraca ($pK_a = 7,73$) que rapidamente forma sais e ésteres. Constitui-se de uma mistura de quatro antibióticos macrolídeos produzidos por cepas de *Streptomyces fradiae*. O principal componente da mistura é a tilosina A (mais de 80%), embora as tilosinas B, C e D possam também estar presentes. A tilosina A, apresentada na Tabela 3.3, contém uma lactona policética (tilactona) substituída com três açúcares 3-deoxiexose (FAO, 2009).

Tabela 3.3: Propriedades físico-químicas da substância Tilosina.

Nome Internacional	Tilosina
Nome (IUPAC)	2-[(4R,5S,6S,7R,9R,11E,13E,15R,16R)-6-[(2R,3R,4R,5S,6R)-5-[(2S,4R,5S,6S)-4,5-dihydroxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-16-ethyl-4-hydroxy-15-[[[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]-5,9,13-trimethyl-2,10-dioxo-1-oxacyclohexadeca-11,13-dien-7-yl]acetaldehyde
Número CAS	1401-69-0
Fórmula molecular	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇
Peso molecular	916,112 g.mol ⁻¹
Pressão de vapor	1,98x10 ⁻³⁴ (25°C)
Solubilidade em água	5 mg/mL (25°C)
Solubilidade em outros solventes	Livremente solúvel em metanol. Solúvel em álcoois inferiores, ésteres e cetonas, clorofórmio, ácidos minerais diluídos, acetato de amila, acetonitrila, hidrocarbonetos clorados, benzeno e éter.
Log K _{ow}	1,63
pK _a	7,73
Estrutura molecular	

Fonte: PubChem

Os antibióticos macrolídeos são compostos bacteriostáticos caracterizados por um anel lactona macrocíclico contendo 14, 15 ou 16 átomos com açúcares ligados por ligações glicosídicas. Atuam ligando-se reversivelmente à subunidade ribossômica 50S, particularmente na molécula 23S do RNA, inibindo a síntese proteica direcionada pelo RNAm, estimulando assim, a dissociação do peptidil-RNAt dos ribossomos durante a translocação. Os macrolídeos mais comumente usados são: eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, diritromicina, claritromicina, fluritromicina,

azitromicina, josamicina, rosamicina, roquitamicina, quitasamicina, miromicina, espiramicina e tilosina (Kanfer, 1998; FAO, 2009).

Os macrolídeos constituem a segunda classe de antimicrobianos quantitativamente mais usados nos animais em geral, perdendo somente para as tetraciclínas (Guardabassi, et al., 2010). No Brasil, os antibióticos macrolídeos estão disponíveis para o tratamento de diversas infecções bacterianas agudas e crônicas em animais. Existem relatos da ocorrência de distúrbios gastro-intestinais, reações de hipersensibilidade e inibição do metabolismo hepático, porém, não há ainda evidências de efeitos tóxicos mais graves devido ao uso de antibióticos macrolídeos (MERCK, 2012). A tilosina, tilmicosina e espiramicina são antimicrobianos macrolídeos que possuem aplicações para animais da espécie bovina, suína e avícola; a josamicina somente para aves; e a azitromicina para animais de companhia (caninos e felinos). Nesta classe de antibióticos, tem sido observado, no mercado brasileiro, um predomínio de tilosina nas formulações dos medicamentos indicados para o tratamento da mastite (CPVS, 2011).

A utilização dos agentes antimicrobianos na medicina humana e veterinária varia conforme a legislação adotada em cada país. Em 1998, a Comunidade Europeia proibiu o uso da tilosina como promotora de crescimento após reconhecer que o vasto uso dessa substância na alimentação animal contribui, a longo prazo, para a seleção de micro-organismos resistentes e sua provável transferência para o homem ou dos seus genes de resistência para outros patógenos (UE, 1998). Nos Estados Unidos, o uso da tilosina é aprovado tanto para fins terapêuticos como promotor de crescimento em animais. Em geral, no mundo inteiro as drogas mais utilizadas como promotores de crescimento incluem macrolídeos, como a tilosina e a espiramicina (Burkin & Galvidis, 2012; Guardabassi, et al., 2010).

No Brasil, ao longo dos anos, o MAPA instituiu diversos grupos de trabalho (GTs), os quais deveriam avaliar o uso da tilosina, entre outros AVs, como aditivo e seu reflexo na Saúde Pública. O GT instituído em 2003, por meio da Portaria nº 808/2003, concluiu que os dados apresentados sugeriam que algumas substâncias – carbadox, olaquinox, bacitracina de zinco, espiramicina, virginiamicina e fosfato de tilosina – poderiam contribuir para a indução de resistência microbiana. No entanto, o risco à saúde humana decorrente da utilização de AVs como aditivos de rações para animais não estava dimensionado e quantificado. Por outro lado, as informações do setor produtivo demonstravam que a sua retirada implicaria em perdas relevantes de eficiência produtiva, com conseqüente prejuízo na produção animal do país. Dessa forma, carbadox, olaquinox e bacitracina

de zinco foram proibidas e, tilosina, espiramicina e virginamicina foram mantidas como aditivos autorizados para uso na alimentação animal (ANVISA, 2018).

Em 2006, um novo GT foi instituído pelo MAPA, por meio da Portaria nº 40/2006, para avaliação das substâncias monensina, maduramicina, avilamicina, flavomicina e enramicina como aditivos melhoradores de desempenho. Entretanto, a partir da avaliação de publicações científicas disponíveis sobre toxicidade e resistência bacteriana, o GT entendeu não haver impeditivo para a continuidade do uso daquelas substâncias como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho (ANVISA, 2018).

Três anos depois, um novo GT foi instituído, por meio da Portaria SDA nº 428/2009, a fim de avaliar as substâncias espiramicina, eritromicina, tiamulina, lincomicina, colistina, clorexidina, halquinol, salinomicina, lasalocida, tilosina, virgianimicina e bacitracina metileno disacilato, como aditivos melhoradores de desempenho. Como conclusão, o GT recomendou a descontinuidade do uso da lincomicina, tiamulina, colistina, espiramicina, eritromicina, clorexidina e halquinol como aditivos melhoradores de desempenho. Entretanto, as outras substâncias - salinomicina, lasalocida, tilosina, virgianimicina e bacitracina metileno disacilato – continuaram permitidas (ANVISA, 2018).

Após contestações frente às conclusões advindas dos GTs, o MAPA e a ANVISA, por meio da nota técnica nº 34/2018/SEI/GEARE/GGALI/DIARE/ANVISA, de 19 de setembro de 2018, responderam questionamentos do Ministério Público Federal frente ao uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho em animais de produção.

A posição da ANVISA se apoiou nas diretrizes mais recentes da OMS (2017) que recomendam a restrição completa do uso de todas as classes de antimicrobianos importantes na medicina humana para promoção do crescimento de animais produtores de alimento, uma vez que estudos sobre o uso de antimicrobianos para tal finalidade indicaram transferência de determinantes de resistência desses animais para humanos. Houve uma clara associação entre o uso de antimicrobianos em animais produtores de alimento e o aumento do risco de exposição e infecção humana por bactérias resistentes a antimicrobianos.

O referido documento da OMS também aborda as possíveis consequências indesejáveis associadas à restrição completa do uso de antimicrobianos na promoção do crescimento de animais produtores de alimento como, por exemplo, o aumento do uso terapêutico de antimicrobianos veterinários, efeitos adversos na saúde animal, bem-estar animal, segurança alimentar, meio ambiente e produção animal, além do aumento dos custos de produção e impactos econômicos. No

entanto, o estudo conclui que essas consequências parecem ser relativamente pequenas ou inexistentes e que muitos países alcançaram com sucesso a restrição completa do uso de antimicrobianos na promoção do crescimento de animais, demonstrando a viabilidade de tal recomendação (OMS, 2017)

Por fim, o documento da OMS traz considerações para a implementação dessa medida, descrevendo opções não antimicrobianas para promover o crescimento ótimo de animais produtores de alimento, incluindo melhoria da higiene, habitação, biossegurança, práticas de criação de animais e melhor uso de vacinas apropriadas. Também ressalta a necessidade do cuidado especial para evitar aumentos compensatórios no uso de antimicrobianos para fins de prevenção ou tratamento de doenças, especialmente antimicrobianos importantes na medicina humana (OMS, 2017; ANVISA, 2018)

Diante de todas as evidências científicas, a ANVISA manifestou concordância com a restrição completa de todas as classes de antimicrobianos importantes na medicina humana para uso na promoção do crescimento de animais produtores de alimento, a não ser que sejam apresentadas evidências robustas que refutem a recomendação da OMS (ANVISA, 2018). E assim, o MAPA publicou a Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018, que informa sobre a intenção de proibição de uso dos antimicrobianos – tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina – com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos. Mais recentemente, a Instrução Normativa que proíbe a utilização dos antimicrobianos tilosina, tiamulina e lincomicina, como aditivos promotores de crescimento (IN SDA nº 01, de 13 de janeiro de 2020) foi publicada com atuação a partir da data de publicação da mesma.

Em destaque no presente trabalho, a tilosina, de uso veterinário exclusivo, é considerada uma substância análoga aos macrolídeos de uso humano e, portanto, teria potencial de impacto na resistência entre os antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana. De acordo com van den Bogaard et al. (2002), a relevância da resistência à tilosina é semelhante à da eritromicina (por alteração do sítio receptor dos ribossomos), verificando-se uma resistência cruzada entre elas. Os demais antimicrobianos proibidos na Portaria nº 171 de 13/12/2018, também estão listados no documento da OMS devido à possibilidade de resistência cruzada: a lincomicina e bacitracina, classificadas como “altamente importante” e “importante” para a medicina humana, e a virginiamicina e tiamulina, antimicrobianos de uso exclusivo veterinário, que também são classificadas como “altamente importante” e “importante” para a medicina humana.

3.2. Disseminação, ocorrência e efeito dos antibióticos veterinários no ambiente

Os antibióticos veterinários (AVs), utilizados para fim terapêutico ou como promotores de crescimento, e seus metabólitos ou produtos de degradação, são inseridos no ambiente terrestre e aquático pela aplicação de estrume ou esterco em áreas usadas para a agricultura e/ou por animais criados em pasto que excretam diretamente sobre o terreno, seguido pelo escoamento superficial e lixiviação em camadas mais profundas (Kemper, 2008). A Figura 3.3 apresenta as principais vias de contaminação de ambientes terrestres e aquáticos com resíduos de fármacos de uso veterinário.

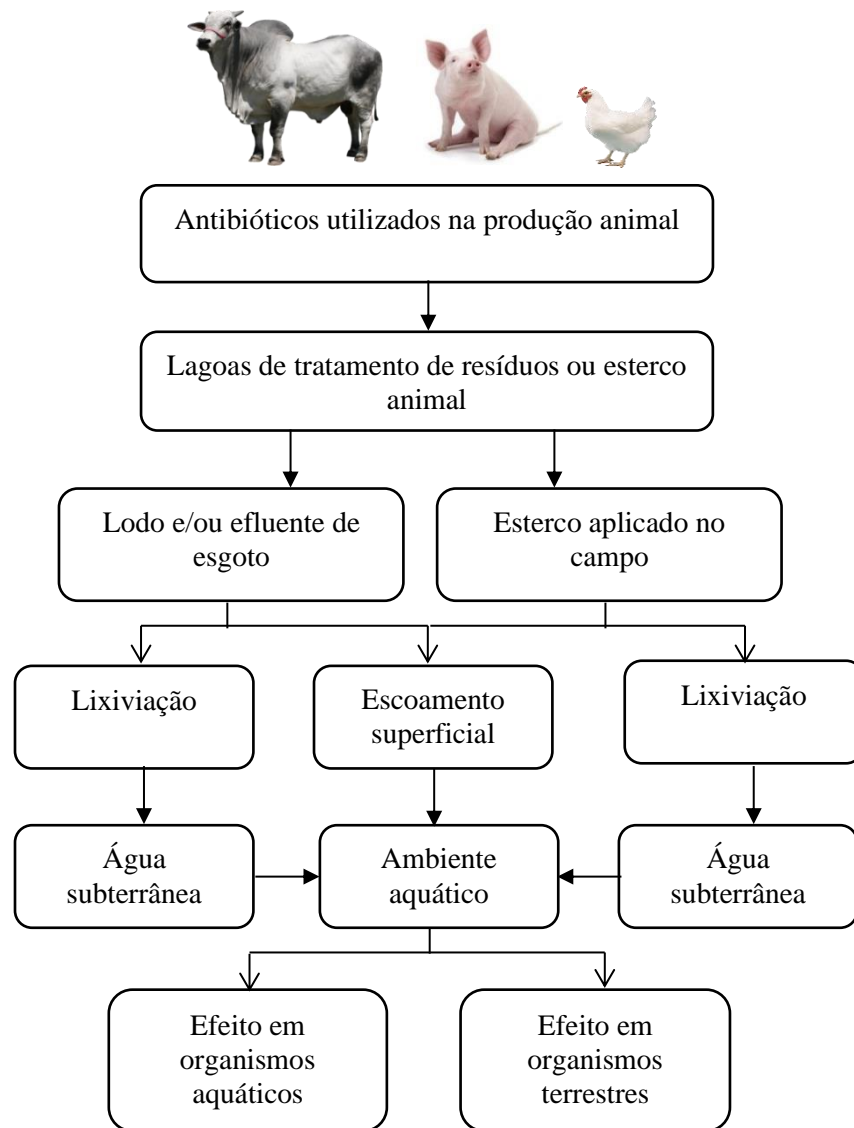


Figura 3.3: Principais vias de exposição aos fármacos de uso veterinário.

Fonte: Adaptado de Regitano and Leal (2010)

A quantidade de antibióticos excretada varia com o tipo de substância, a dosagem, a espécie animal, a idade, o modo de aplicação, dentre outros fatores (Kemper, 2008). Como são substâncias bioativas, que atuam de forma eficaz em doses baixas e são excretadas após um curto período de tempo de residência, até 95% dos antibióticos administrados em animais podem ser integralmente eliminados sem sofrer qualquer metabolização no trato digestivo animal (Sarmah, Meyer and Boxall, 2006; Kemper, 2008). Mesmo quando a molécula é em grande parte metabolizada, alguns dos produtos de degradação excretados podem permanecer bioativos (Thiele-Bruhn, 2003). Além disso, os metabólitos produzidos podem ser transformados de volta para o seu composto de origem após a excreção. Por exemplo, alguns antibióticos são transformados para as formas conjugadas, tais como os metabólitos acetilados, tornando-se inativos e analiticamente camuflados. Contudo, no esturme o grupo acetil pode ser clivado por degradação biológica, liberando o composto original (Christian et al., 2003).

A ocorrência e o destino dos antibióticos veterinários são considerados ameaças ambientais frente ao aparecimento e desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos (BRAs), que está associado, principalmente, em razão da contínua pressão de seleção exercida pela administração de baixas concentrações desses agentes (Chander et al., 2007). Nesse caso, o uso contínuo e prolongado de dosagens subletais de antibióticos e da subsequente disseminação do material fecal no solo, poderia ocasionar o compartilhamento de plasmídeos extra-cromossômicos resistentes com aqueles dos organismos não resistentes (Thiele-Bruhn, 2003; Sarmah, Meyer and Boxall, 2006). Outra possibilidade é de que as baixas concentrações de resíduos de antibióticos transferidas ao solo pela aplicação de esterco animal contaminado favoreçam a seleção de populações resistentes (Schmitt et al., 2006).

A Tabela 3.4 resume as faixas de ocorrência de alguns antibióticos veterinários encontrados em diferentes amostras ambientais de diferentes países. De acordo com o levantamento realizado, altas concentrações de clortetraciclina ($121,8 \text{ mg.kg}^{-1}$) foram detectadas em amostras de esturme suíno em uma província no norte da China (Zhang, Zhang, & Gu, 2008), enquanto elevados teores de enrofloxacin (1421 mg.kg^{-1}) foram verificados em amostras de esterco de galinhas em outras oito províncias chinesas (Zhao, Dong, & Wang, 2010), ressaltando a grande utilização desses antibióticos nesse país.

Ressalta-se ainda, os baixos teores de antibióticos veterinários detectados em diferentes amostras ambientais brasileiras (Leal et al., 2012; Pinheiro et al., 2013), como possível resultado das ações adotadas pelo MAPA para conter o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos em

animais. Entretanto, ainda faltam estudos mais abrangentes sobre o uso e ocorrência de antibióticos veterinários no Brasil, bem como seus possíveis efeitos no ecossistema e a dinâmica desses compostos no solo (Regitano and Leal, 2010).

Apesar da significativa ocorrência de AVs no ambiente, a introdução de microrganismos resistentes, provenientes das fezes de animais tratados com antibióticos, é mais importante para a resistência do que a indução em função da presença de resíduos de antibióticos no ambiente (Thiele-Bruhn, 2003). Dessa maneira, sabe-se que a real fonte de resistência microbiana no ambiente não é a presença dos princípios ativos em si, mas o aporte de bactérias já resistentes, veiculadas por meio de águas residuárias e esterco, selecionadas em organismos durante o tratamento terapêutico com antibióticos (Kümmerer, 2009). Nesse contexto, as mais importantes cepas resistentes aos antibióticos são as salmonelas e a bactéria *Escherichia coli*, multirresistentes à antibióticos, como ampicilina, amoxicilina, tetraciclina, sulfonamidas e aminoglicosídeos; espécies de *Campylobacter spp.*, resistentes a macrólidos e fluoroquinolonas; e espécies de *Enterococcus spp.*, resistentes à glicopeptídeos e estreptograminas. Em todos os casos, a cadeia alimentar é o principal meio de transmissão das bactérias resistentes (Phillips, 2003).

Além do aporte de bactérias resistentes, a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) é resultado do uso extensivo de antibióticos veterinários, o que está correlacionado com o aumento de GRAs em patógenos bacterianos humanos (Zhu *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2015). Os GRAs podem ser disseminados entre diferentes populações microbianas através da transferência horizontal de genes. Desse modo, bactérias resistentes a antibióticos podem ser formadas e facilmente infectar os seres humanos por contato ou consumo de vegetais crus. Por exemplo, o estudo de Forsberg *et al.* (2014) mostrou que as comunidades microbianas eram o principal determinante de GRAs em amostras de solo. Outro estudo mais recente (Luo *et al.*, 2017) mostrou que variáveis como temperatura, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentração de substrato e ácidos orgânicos voláteis podem afetar a composição dos GRAs em reatores anaeróbios, uma vez que são determinantes na seleção de comunidades microbianas.

Tabela 3.4: Faixas de ocorrência de alguns antibióticos veterinários encontrados em amostras ambientais.

Composto	Amostra ambiental	País	Faixa de ocorrência ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referências
Clortetraciclina (CTC)	Água	Coréia do Sul	0,53 – 0,76	Ok et al. (2011)
	Solo		0,31 – 0,89	
	Estrume suíno	China	0,3 – 121,8*	Zhang, Zhang, and Gu (2008)
	Esterco galinha	China	0,16 – 17,68*	Zhao, Dong, and Wang (2010)
	Esterco suíno		0,16 – 21,06*	
	Esterco bovino		0,24 – 27,59*	
	Solo de fazenda	Brasil	0,04 – 0,36	Pinheiro et al. (2013)
	Esterco suíno	Áustria	0,1 – 46	Martínez-Carballo et al. (2007)
	Esterco aves		>1,7	
Oxitetraciclina (OTC)	Água	Coréia do Sul	0,39 – 1,41	Ok et al. (2011)
	Solo		1,68 – 3,77	
	Estrume suíno	China	0,2 – 134*	Zhang, Zhang, and Gu (2008)
	Esterco galinha	China	0,27 – 10,56*	Zhao, Dong, and Wang (2010)
	Esterco suíno		0,15 – 59,06*	
	Esterco bovino		0,32 – 59,59*	
	Esterco suíno	Áustria	0,21 – 29*	Martínez-Carballo et al. (2007)
Tetraciclina (TC)	Água	Coréia do Sul	0,50 – 0,58	Ok et al. (2011)
	Solo		0,82 – 2,94	
	Esterco suíno	Áustria	0,36 – 23*	Martínez-Carballo et al. (2007)
Sulfametazina (SMZ)	Água	Coréia do Sul	0,31 – 9,12	Ok et al. (2011)
	Sedimento		39,37 – 70,32	
	Solo		20,30 – 28,38	
Sulfametoxazole (SMX)	Água	Coréia do Sul	0,36 – 0,38	Ok et al. (2011)
	Sedimento		8,91 – 12,20	
	Solo		0,77 – 5,43	

*Valores expressos em mg.kg^{-1} .

Tabela 3.4: Faixas de ocorrência de alguns antibióticos veterinários encontrados em amostras ambientais (continuação).

Composto	Amostra ambiental	País	Faixa de ocorrência ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
Sulfatiazole (STZ)	Água	Coréia do Sul	0,30 – 5,35	Ok et al. (2011)
	Sedimento		23,68 – 40,31	
	Solo		24,39 – 38,82	
Sulfadimidina (SM2)	Solo de fazenda	Brasil	0,018 – 0,082	Pinheiro et al. (2013)
	Esterco suíno	Áustria	>20*	Martínez-Carballo et al. (2007)
Trimetropina (TMP)	Esterco aves	Áustria	<17*	Martínez-Carballo et al. (2007)
Avilamicina (AVI)	Esterco suíno	Reino Unido	<6,2*	Sunderland et al. (2004)
Tilosina (TYL)	Água	Coréia do Sul	0,23 – 2,19	Ok et al. (2011)
	Sedimento		12,32 – 13,38	
	Solo		84,47 – 222,84	
Enrofloxacina (ENO)	Cama de frango	Brasil	0,39 – 30,97*	Leal et al. (2012)
	Solos		0,017 – 0,027*	
	Cama de frango	Turquia	0,06*	Karci and Balcioğlu (2009)
	Solos		0,05*	
	Cama de frango	Áustria	>2,8*	Martínez-Carballo et al. (2007)
	Solos		0,37*	
	Esterco galinha	China	0,33 – 1421*	Zhao, Dong, and Wang (2010)
	Esterco suíno		0,48 – 33,26*	
Esterco bovino		1,72 – 46,70*		
Ciprofloxacina (CIP)	Cama de frango	Brasil	0,65 – 2,13*	Leal et al. (2012)
	Esterco galinha	China	0,68 – 45*	Zhao, Dong, and Wang (2010)
	Esterco suíno		0,64 – 33,98*	
	Esterco bovino		0,49 – 29,59*	

*Valores expressos em mg.kg^{-1} .

3.2.1. Resistência antimicrobiana associada a resíduos da produção animal

Como consequência da produção intensiva de proteína animal, segundo levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS), foram consumidas 2.225,47 toneladas de antibióticos veterinários no Brasil em 2016, o maior consumo em um ranking de 65 países desenvolvidos e subdesenvolvidos. No mesmo ano, os antibióticos mais consumidos no país foram os pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, como a penicilina, seguidos dos macrolídeos, quinolonas e tetraciclina. Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), entre 2010 e 2015, as tetraciclina e os macrolídeos foram os antibióticos mais utilizados para a criação de animais nos países americanos. Apesar da proibição de várias dessas substâncias utilizadas como promotoras de crescimento no Brasil, como as tetraciclina e alguns beta-lactâmicos, pode-se observar que essas substâncias ainda podem causar efeitos no meio ambiente, como a disseminação de resistência observada em muitos estudos.

O risco do aumento de Bactérias Resistentes a Antibióticos (BRAs) para a saúde pública levou a uma série de ações governamentais motivadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), visando controlar o uso de antibióticos, entender seu impacto sobre o meio ambiente e desenvolver novos medicamentos. A capacidade de certas bactérias compartilharem seus mecanismos de resistência de bactérias animais a bactérias humanas foi encontrada quando o uso de avoporcina, um glicopeptídeo usado nos EUA para alimentação animal na década de 80, foi correlacionado com o surgimento de cepas de linhagens de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em hospitais (Arias & Murray, 2008).

Várias bactérias podem transmitir seus mecanismos de resistência a outros microrganismos através de transferências ou aquisição de material genético, genes de resistência a antibióticos (GRAs). As principais formas de contaminação por BRAs e GRAs no manejo de animais são a liberação de resíduos brutos e/ou tratados em estações de tratamento. Pesquisas indicam que mesmo os resíduos tratados são fontes de BRAs que carregam genes de resistência potencialmente transferíveis e poderiam se espalhar facilmente em ecossistemas naturais (Li, et al, 2015; Servais; Passerat, 2009; Rizzo, Manaia; Merlin, 2013; Stalder, Barraud e Jove, 2014; Karkman et al., 2018; Su, et al., 2017).

A resistência aos antibióticos acontece por mutação em um *loci* do cromossomo ou pela transferência horizontal de genes (cromossômicos ou plasmidiais). Os genes responsáveis pela resistência contidos em plasmídeos, normalmente codificam enzimas que inativam os antibióticos

ou reduzem a permeabilidade das células. Em contraste, a resistência conferida por mutações cromossomais envolve a modificação do alvo (Neihardt, 2004). Diferente do que ocorre na transferência vertical de genes, em que existe a replicação do genoma e a divisão celular entre duas células filhas para cada célula mãe, a transferência horizontal de genes envolve a aquisição de genes de resistência anteriormente presentes em outros microrganismos, de maneira distinta ao processo hereditário (Dzidic, Suskovic, & Kos, 2007).

Nas bactérias, ocorrem pelo menos três formas de transferência horizontal de genes, que são conhecidos como conjugação, transformação e transdução. Na conjugação, a transferência de DNA envolve o contato célula-célula e um plasmídeo conjugativo (pilus de conjugação) na célula doadora. Na transformação, o DNA livre é liberado de uma célula, sendo capturado por outra. Por fim, na transdução, a transferência de DNA é mediada por um vírus (bacteriófago ou fago), podendo ocorrer entre células bacterianas ou de células bacterianas para células animais ou vegetais (Dzidic, Suskovic, & Kos, 2007). A Figura 3.4 compara as formas de transferência horizontal de genes.

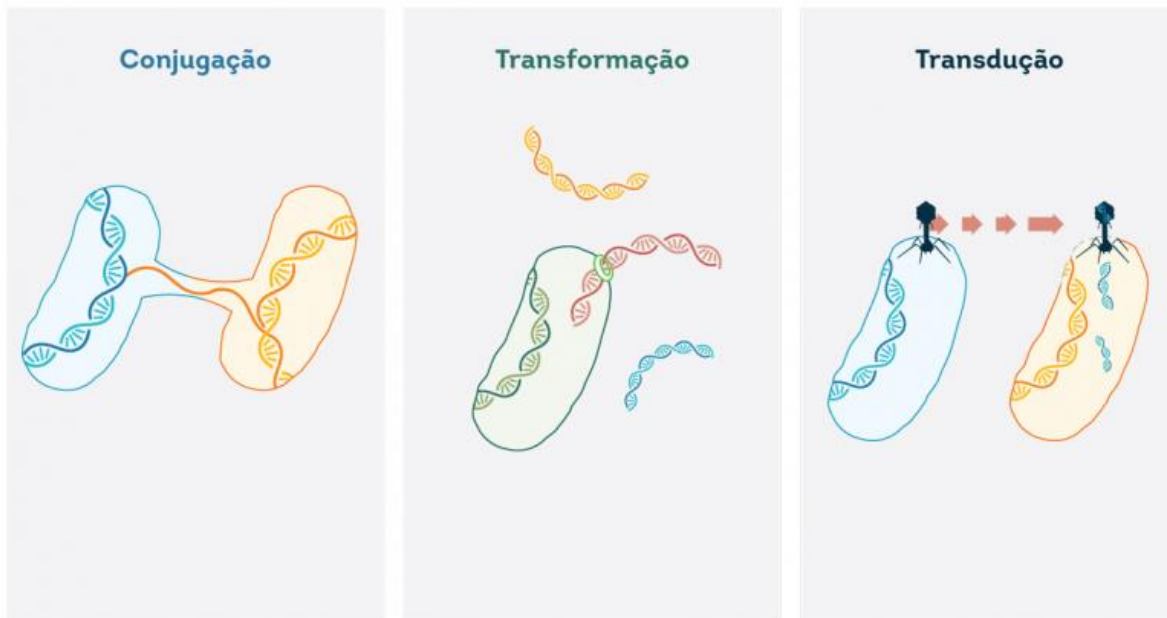


Figura 3.4: Esquema comparativo entre as formas de transferência horizontal de genes.

Fonte: CropLife Brasil, 2020.

Uma vez inseridos nas bactérias, os genes transferidos podem conferir quatro diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos, que são: alteração da permeabilidade da parede celular,

alteração do alvo de ação do antibiótico na célula, bomba de efluxo e mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico. Esses mecanismos estão representados na Figura 3.5. Os genes associados a cada antibiótico, com seus respectivos mecanismos de resistência, estão detalhados na Tabela 3.5.

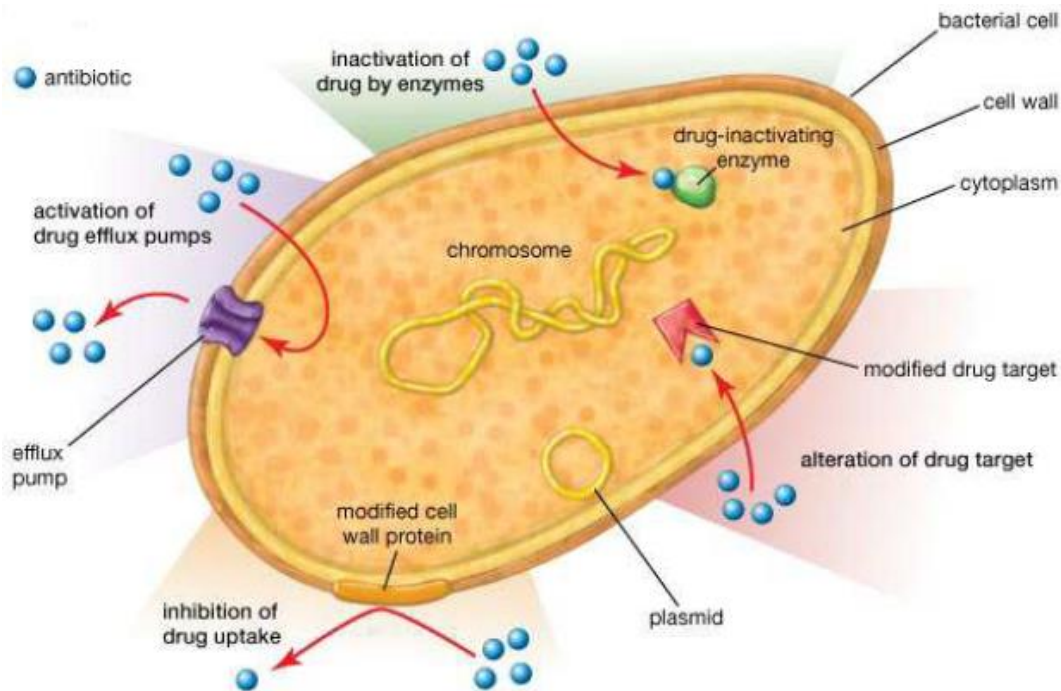


Figura 3.5: Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência bacteriana.

Fonte: Baptista, 2013.

A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida quer seja bacteriostático. Quando o gene de resistência provoca modificação na permeabilidade do antibiótico, isto pode dever-se às alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas. Os antibióticos como os β -lactâmicos, fluoroquinolonas e tetraciclina penetram no interior da célula através das porinas presentes na membrana externa. Qualquer diminuição na função ou na quantidade de porinas levará à resistência da bactéria ao antibiótico, baixando o nível do antibiótico no interior da bactéria (Dzidic, Suskovic, & Kos, 2007; Declour, 2009).

A resistência do tipo ‘alteração do alvo de ação’ caracteriza-se pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação original. Isto ocorre por alteração da estrutura do peptidoglicano (β -lactâmicos e glicopeptídeos), interferência na síntese de proteínas

(aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, estreptograminas, oxazolidinonas) ou na síntese de DNA (fluoroquinolonas) (Dzidic, Suskovic, & Kos, 2007).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, isto é, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. Esse mecanismo afeta todas as classes de antibióticos, no entanto, apresenta maior eficácia na presença de macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas, pois estes inibem a síntese de proteínas e de DNA (Dzidic, Suskovic, & Kos, 2007). Por fim, o mecanismo enzimático de resistência devido à inativação do fármaco, resulta da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, seja via hidrólise (β -lactâmicos), transferência de um grupo químico específico (aminoglicosídeos, anfenicóis, fosfomicina, estreptograminas e macrolídeos) ou processo redox (tetraciclina) (Dzidic, Suskovic, & Kos, 2007).

O levantamento de diversos estudos científicos mostra a detecção, e por vezes a quantificação, de diferentes genes que conferem resistência a antibióticos em amostras relacionadas à atividade avícola, como cama de aviário e esterco. Esses dados estão compilados na Tabela 3.6. Nessa tabela, é possível observar que os genes *tet* (tetraciclina), *sul* (sulfonamidas) e *erm* (eritromicina) foram os mais frequentemente detectados nas amostras de esterco de aves ou de cama de aviário. Além disso, é possível identificar que alguns trabalhos detectaram a presença de genes de resistência à aminoglicosídeos (via inativação do antibiótico por acetilases – *aac*, adenilases – *aad*, ou por fosfotransferases – *aph*) em amostras de cama de aviário (Lu et al., 2003) e esterco de aves (Diarra et al., 2010).

Como apresentado na Tabela 3.6, poucos trabalhos mostram a quantificação de cópias de DNA em resíduos avícolas. Em um deles, Zhang et al. (2016) mostra a redução quantitativa de GRAs após submeter o resíduo de cama de aviário a 26 dias de compostagem, passando de 0,58 logs de cópias GRAs/cópias rDNA 16S para 0,12 logs de cópias GRAs/cópias rDNA 16S. Os autores mostram ainda redução significativa de GRAs ao aplicar surfactantes durante a compostagem do resíduo. De forma similar, Li et al. (2017) apresenta a redução em 0,6 logs de cópias de GRAs ao submeter um resíduo de cama de aviário a 26 dias de compostagem. No mesmo trabalho, os autores demonstram melhores resultados de redução de GRAs (1,15 logs), ao aplicar carvão de bambu em pó (20% m/m) durante a compostagem.

Tabela 3.5: Principais genes de resistência a antibióticos e seus mecanismos de ação.

GRAs	Antibiótico relacionado	Mecanismo de resistência	Exemplos de genes
<i>tet</i>	Tetraciclinas	Inativação do antibiótico por modificação enzimática	<i>tetX</i>
		Síntese de proteína de proteção ribossômica	<i>tetM, tetW</i>
		Ativação de efluxo celular	<i>tetA, tetB, tetC, tetD, tetK, tetL, tetV, tetY</i>
<i>erm</i>	Eritromicina	Alteração do sítio ativo do antibiótico	<i>ermA, ermB, ermC</i>
<i>ere</i>		Inativação do antibiótico por modificação enzimática	<i>ereA, ereB</i>
<i>tlr</i>	Tilosina, Lincosamidas	Alteração do sítio ativo do antibiótico	<i>tlrB</i>
<i>sul</i>	Sulfonamidas	Alteração do sítio ativo do antibiótico	<i>sul1, sul2, sul3</i>
<i>bla,</i>	β-lactâmicos	Inativação do antibiótico por modificação enzimática	<i>blaA, blaB, bla1</i>
<i>aad</i> <i>aac</i> <i>str</i> <i>aph</i>		Aminoglicosídeos	Inativação do antibiótico por modificação enzimática
<i>mex</i> <i>emr</i>	Ativação de efluxo celular		<i>mexY, mexE, mexH</i> <i>emrE, emrD</i>
<i>lnu</i>	Lincosamidas		Inativação do antibiótico por modificação enzimática
<i>mph</i>	Macrolídeos	Inativação do antibiótico por modificação enzimática	<i>mphA, mphB</i>
<i>msr</i>	Macrolídeos-Lincosamidas-Streptogramina B	Ativação de efluxo celular	<i>msrA</i>
		Alteração do sítio ativo do antibiótico	<i>msrB, msrC, msrE</i>
<i>mef</i> <i>ole</i>	Vancomicina	Ativação de efluxo celular	<i>mefA</i> <i>oleB</i>
<i>van</i>		Alteração do sítio ativo do antibiótico	<i>vanA, vanB, vanC</i>
<i>dfr</i>	Trimetropina	Alteração do sítio ativo do antibiótico	<i>dfrA1, dfrA5</i>
<i>mec</i>	Meticilina	Alteração do sítio ativo do antibiótico	<i>mecA, mecR1</i>
<i>qac</i>	Fluoroquinolona	Ativação de efluxo celular	<i>qacA, qacB</i>
<i>qnr</i>	Quinolona	Proteção do sítio ativo do antibiótico	<i>qnrA, qnrB</i>

Fonte: ARDB (2019)

Tabela 3.6: Ocorrência de genes de resistência a antibióticos em amostras de dejetos avícolas

Amostra ambiental	País de origem	Genes de resistência detectados	Referência
Cama de aviário	EUA	<i>ermA, ermB, ermC, msrA</i>	Khan et al. (2002)
Cama de aviário	EUA	<i>aadA1, aadA2, aacA7, aac6'1a, aac6'1q, aac6'2a, aac6'2b, aac3'1a, aac3'1b, aacA4, aacC1, aacC1, aadB, aac6'1d, catB2, catB3, catB4, catB5, catB6, cmlA</i>	Lu et al. (2003)
Cama de aviário	EUA	<i>sul1, int11, aadA, int12</i>	Nandi et al. (2004)
Cama de aviário	EUA	<i>ermA, ermB, ermC, msrA, msrB, msrC, vatE</i>	Graham et al. (2009)
Cama de aviário		<i>tetC, tetG, tetM, tetW, sul2, ermF, int11(0,58 logs cópias GRAs/cópias de rDNA 16S)</i>	
Cama de aviário após 26 dias de compostagem	China	<i>tetC, tetG, tetW, tetX, sul1, sul2, ermF, aac61-Ib-cr, int11 (0,12 logs cópias GRAs/cópias rDNA 16S)</i>	Zhang et al. (2016)
Cama de aviário		<i>int11, tetC, tetG, tetW, tetX, sul1, sul2, drfA7, ermF, ermX (1,6 logs cópias GRAs/cópias rDNA 16S)</i>	
Cama de aviário após 26 dias de compostagem	China	<i>int11, tetC, tetG, tetX, sul1, sul2, drfA7(1,0 log cópia GRAs/cópias rDNA 16S)</i>	Li et al. (2017)
Esterco de aves	Dinamarca	<i>ermC, ermA, vatB, vgaB, tetK, tetM</i>	Aarestrup et al., (2000)
Esterco de aves	Canadá	<i>aac, aacA-aphD, aadB, aphA, sat4, ermA, ermB, ermAM, msrC, tetL, tetM, tetO, satG_vatE8, bcrR, linB</i>	Diarra et al. (2010)
Esterco de aves	China	<i>sul1, sulII, sulIII, sulA, tetM, tetW, tetO</i>	Ji et al. (2012)
Esterco de aves	EUA	<i>tetK, tetL, tetM, tetO, ermA, ermB, ermC, ermF</i>	You et al. (2012)
Esterco de aves	Nigéria	<i>tetK, tetL, tetM, tetO, ermB</i>	Ngbede et al. (2017)

3.2.2. *Degradação de antibióticos via digestão anaeróbia e efeito na produção de biogás*

Preliminarmente à sua disposição ao meio ambiente, os dejetos animais são submetidos a uma variedade de práticas de manejo, incluindo armazenamento em poço ou em pilhas, compostagem, digestão anaeróbia ou degradação em lagoas aeradas (Mitchell et al., 2013). A digestão anaeróbia (AD) tem se mostrado eficiente no tratamento de dejetos animais, bem como na redução de odores e patógenos (Mitchell et al., 2013), além de permitir a produção de biogás rico em metano (CH_4), que pode ser usado para gerar eletricidade, calor ou combustível comprimido para transporte (US EPA, 2006).

A conversão biológica da matéria orgânica complexa a metano, sob condições anaeróbias, ocorre por uma série de reações em cadeia, desenvolvidas por grupos distintos de microrganismos anaeróbios. Inicialmente a matéria orgânica é transformada a compostos solúveis (açúcares, aminoácidos, triglicerídeos) por bactérias hidrolíticas. Uma vez solubilizados, estes compostos são utilizados por microrganismos fermentativos acidogênicos e convertidos a acetato, outros ácidos graxos de cadeia curta (propiónico, butírico, valérico), alcoóis, hidrogênio e gás carbônico. A etapa seguinte da digestão anaeróbia consiste na ação de bactérias acetogênicas envolvidas na conversão dos produtos orgânicos a ácido acético, hidrogênio e gás carbônico. A partir daí, metano pode ser produzido ora por arqueias metanogênicas que usam o ácido acético como substrato, ora por bactérias hidrogenotróficas a partir de hidrogênio e gás carbônico (Lalman and Bagley, 2000).

As condições operacionais iniciais podem afetar a estabilidade e o desempenho dos digestores anaeróbios, nos quais compostos orgânicos são decompostos por um vasto número de microrganismos. Fatores como substrato, temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica (TDH), bem como o tipo e a concentração de antibióticos e outros antimicrobianos inseridos na alimentação animal, podem causar impactos na microflora anaeróbia (Massé et al. 2004). Diante disso, a investigação sobre o efeito dos antimicrobianos presentes em dejetos animais, na produção de biogás, tem sido extensivamente estudada, como mostra os trabalhos descritos na Tabela 3.7.

Embora a presença de alguns antibióticos em dejetos animais apresente um efeito notável e adverso na produção de metano via digestão anaeróbia (Tabela 3.7), para os macrolídeos tilosina e eritromicina, as referências encontradas (Massé et al., 2004; Poels, Van Assche & Verstraete, 1984) indicam que a presença desses antibióticos não causaram qualquer efeito sobre a produção de biogás a partir de dejetos suínos. Contudo, cabe ressaltar que os estudos de Poels, Van Assche, & Verstraete (1984) e de Massé et al. (2004) empregaram elevados tempos de detenção hidráulica,

20 semanas e 1 ano, respectivamente, discrepantes dos praticados no nosso país. Cabe destacar que não foram encontrados estudos feitos no Brasil sobre o efeito da tilosina em digestores anaeróbios operados nas nossas condições ambientais. Estudos com esse antibiótico são importantes para elucidar sua cinética e produtos de degradação sob condições anaeróbias, bem como para determinar os efeitos de diferentes concentrações deste antimicrobiano na produção de biogás e o impacto do lançamento de efluentes e lodos anaeróbios no ambiente.

Alguns autores investigaram a degradação anaeróbia de antibióticos presentes em dejetos animais, tanto via processos contínuos quanto batelada. Por exemplo, o efeito e degradação de oxitetraciclina (OTC) durante a digestão anaeróbia de estrume de bezerros medicados foi avaliado por Arikan *et al.* (2006). Cinco bezerros de corte foram medicados por 5 dias com $22 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de OTC. As amostras de estrume foram coletadas antes e após a medicação, diluídas e inoculadas em digestores anaeróbios de 1,2L a 35°C . Os níveis de OTC no esterco digerido diminuíram de 9,8 a $4,1 \text{ mg.L}^{-1}$ em 64 dias, conferindo uma remoção de 59%. Dois metabólitos da OTC (α – apo – oxitetraciclina e β – apo – oxitetraciclina) diminuíram ou permaneceram constantes durante o processo de digestão anaeróbia.

Dolliver, Gupta and Noll (2008) investigaram a degradação de CTC ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), monesina ($11,9 \text{ mg.kg}^{-1}$), sulfametazina ($10,8 \text{ mg.kg}^{-1}$) e tilosina ($3,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) a partir de dejetos de peru por meio de compostagem. Os autores verificaram que a degradação da CTC ocorre rapidamente, atingindo uma redução $>99\%$ e tempo de meia-vida de 1 dia. Entretanto, monesina e tilosina foram degradadas de forma gradual, atingindo um intervalo de redução dentre 54 – 76% e tempo de meia-vida de 17 e 19 dias, respectivamente. Adicionalmente observou-se que a sulfametazina não sofreu degradação.

Por sua vez, Oliveira (2016) avaliou a degradação de sulfametazina (SMZ) em três configurações de reatores anaeróbios diferentes: reator horizontal de leito fixo (RAHLF), reator anaeróbio de mistura e biomassa imobilizada (RAMBI) e reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB). As condições operacionais que permitiram a máxima remoção de SMZ foram TDH de 24h e DQO total afluyente de $3000 \text{ mg O}_2/\text{L}$ de água residuária sintética simulando o efluente de suinocultura, que resultaram em eficiências médias de remoção de SMZ, inicialmente a $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, de 74%, 71% e 70% para os reatores RAHLF, RAMBI e UASB, respectivamente. Na concentração avaliada, os autores não verificaram nenhuma influência da SMZ na produção de biogás.

Alguns estudos investigaram a degradação de antibióticos macrolídeos, especialmente eritromicina, em sistemas anaeróbios tratando efluente de suinocultura. Schlüsener, von Arb & Bester (2006) avaliaram a degradação de eritromicina em um experimento de 180 dias, contendo efluente de suinocultura e o antibiótico na concentração de $2000 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Os autores verificaram que o antibiótico sofreu degradação de 1ª ordem superior a 90% ao final do experimento e apresentou tempo de meia-vida de 41 dias. Em um estudo mais recente, Feng et al. (2017) encontraram 99% e 20% de degradação de eritromicina em sistemas anaeróbios termofílicos (52°C) e psicofílicos (15°C), respectivamente. No primeiro caso, o antibiótico apresentou tempo de meia-vida de 3 dias para uma cinética de 1ª ordem.

Como descrito no tópico anterior, os trabalhos de Zhang et al. (2016) e Li et al. (2017) mostraram que a simples submissão da cama de aviário a um processo de compostagem prévio, já seria capaz de reduzir os seletores de resistência antimicrobiana, como os GRAs. Não obstante, o processo de digestão anaeróbia também poderia ser aplicado para essa finalidade, como mostra o estudo de Anjum, Grohmann & Krakat (2017) que avaliaram o impacto da digestão anaeróbia termofílica (60°C) da cama de aviário na dinâmica de bactérias e genes de resistência a antibióticos. Os autores reportaram que o tratamento termofílico promoveu uma clara mudança de bactérias patogênicas para não-patogênicas. A porcentagem de *Staphylococcus* sp., *Vagococcus* sp., *Tylorella* sp. e *Bacillus cereus*, na amostra nativa, foi de 42%, 50%, 3,8% e 3,8%, respectivamente. Após o tratamento térmico, apenas os não-patogênicos *Bacillus* sp. estavam presentes no digerido. Quanto à resistência antimicrobiana, os isolados de amostras nativas foram resistentes a 10 antibióticos com percentual entre 6,2% (amoxicilina) e 78,8% (ácido nalidíxico). Em contraste, as bactérias isoladas de amostras tratadas termicamente possuíam resistência exclusiva contra a bacitracina (11,5%). Assim, os autores concluíram que o tratamento termofílico do esterco de aves tem a capacidade de eliminar a maioria dos elementos de resistência antimicrobiana.

Tabela 3.7: Efeito de antibióticos na produção de metano na digestão anaeróbia de dejetos animais em diferentes sistemas de tratamento.

Composto	Concentração aplicada (mg.L ⁻¹)	Efeito no CH ₄ (%)	Condições operacionais	Referências
Avilamicina (AVI)	20* (G)	Nenhum efeito	Biodigestor 20L / TCO: 3,5 kg SVT.m ⁻³ / 35°C / TDH: 19 sem.	Sutton et al. (1989)
	80* (S)	Nenhum efeito		
Bacitracina (BAC)	3,3 / 16,7 / 33,3 (S)	↓ 86% (33,3 mg.L ⁻¹ – 6 dias)	Fermentador 1,5L / TCO: 2-4 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 30°C / TDH: 20d	Poels, Van Assche, and Verstraete (1984)
Cefazolina (CFZ)	30 / 60 / 90 (B)	Nenhum efeito	Batelada 1L / 55°C / TDH: 16d	Beneragama et al. (2013)
Ciprofloxacina (CIP)	10 / 100 / 500 (L)	Nenhum / ↑ 21% / ↑ 5,4%	Batelada 300 mL / 37°C / TS: 20% / TDH: 25d	Zhi & Zhang (2019)
Clortetraciclina (CTC)	3,3 / 16,7 / 33,3 (S)	Nenhum efeito	Fermentador 1,5L / TCO: 2-4 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 30°C / TDH: 20d	Poels, Van Assche, and Verstraete (1984)
Cloranfenicol (CFC)	16,7 / 83,3 / 166,6 (S)	Nenhum efeito	Fermentador 1,5L / TCO: 2-4 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 30°C / TDH: 20d	Poels, Van Assche, and Verstraete (1984)
Enrofloxacina (ENO)	10 / 100 / 500 (L)	Nenhum / ↑ 38% / ↓ 59%	Batelada 300 mL / 37°C / TS: 20% / TDH: 25d	Zhi & Zhang (2019)
Eritromicina (ERY)	0,4 / 2,0 / 4,0 (S)	Nenhum efeito	Fermentador 1,5L / TCO: 2-4 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 30°C / TDH: 20d	Poels, Van Assche, and Verstraete (1984)
Lincomicina (LIN)	220* (S)	Nenhum efeito	SBRs 40L / TCO: 2,2-3,5 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 20°C / TDH > 1a	Massé et al. (2004)
Norfloxacina (NOR)	10 / 100 / 500 (L)	↓ 8,6% / ↑ 15% / ↑ 33%	Batelada 300 mL / 37°C / TS: 20% / TDH: 25d	Zhi & Zhang (2019)

*Valores expressos em mg.kg⁻¹. (B) Bovinos; (G) Galinhas; (S) Suínos; (L) lodo. TCO: Taxa de carregamento orgânico; TDH: Tempo de detenção hidráulica; SBR: *Sequencing Batch Reactors*

Tabela 3.7: Efeito de antibióticos na produção de metano na digestão anaeróbia de dejetos animais em diferentes sistemas de tratamento (cont.).

Composto	Concentração aplicada (mg.L ⁻¹)	Redução CH ₄ (%)	Condições operacionais	Referências
Ofloxacina (OFL)	10 / 100 / 500 (L)	↑ 12% / ↑ 60% / ↓ 89%	Batelada 300 mL / 37°C / TS: 20% / TDH: 25d	Zhi & Zhang (2019)
	4* (B)	↓ 50% - 60% (5 dias)	Batelada 0,12L / 37°C / TDH: 30d	Ince et al. (2013)
Oxitetraciclina (OTC)	30 / 60 / 90 (B)	↓ 31,4% (90 mg.L ⁻¹ – 16 dias)	Batelada 1L / 55°C / TDH: 16d	Beneragama et al. (2013)
	10 / 100 / 500 (L)	Nenhum / ↑ 33% / ↑ 17%	Batelada 300 mL / 37°C / TS: 20% / TDH: 25d	Zhi & Zhang (2019)
Penicilina (PNC)	16* (S)	↓ 35%	SBRs 40L / TCO: 2,2-3,5 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 20°C / TDH > 1a	Massé et al. (2004)
	110* (S)	Nenhum efeito	SBRs 40L / TCO: 2,2-3,5 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 20°C / TDH > 1a	Massé et al. (2004)
Sulfametazina (SMZ)	0,1 (S)	Nenhum efeito	RAHLF (1,8L), RAMBI (1,1L), UASB (1,5L) / DQO: 3000 mg.L ⁻¹ / TDH: 24h	Oliveira (2016)
	25 / 50 (B)	↓ 33% (20 dias)	Batelada 1L / 25°C / TDH: 20d	Shi et al. (2011)
Sulfametóxidiazina (SMD)	10 / 100 / 500 (L)	↓ 15,5% / ↑ 27% / ↓ 84,8%	Batelada 300 mL / 37°C / TS: 20% / TDH: 25d	Zhi & Zhang (2019)
Tilosina (TYL)	1,7 / 8,3 / 16,7 (S)	Nenhum efeito	Fermentador 1,5L / TCO: 2-4 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 30°C / TDH: 20d	Poels, Van Assche, and Verstraete (1984)
	110* (S)	Nenhum efeito	SBRs 40L / TCO: 2,2-3,5 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 20°C / TDH > 1a	Massé et al. (2004)
Virginiamicina (VIR)	1,7 / 8,3 / 16,7 (S)	↓ 87% (16,7 mg.L ⁻¹ – 4 dias)	Fermentador 1,5L / TCO: 2-4 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ / 30°C / TDH: 20d	Poels, Van Assche, and Verstraete (1984)

*Valores expressos em mg.kg⁻¹. (B) Bovinos; (G) Galinhas; (S) Suínos; (L) lodo. TCO: Taxa de carregamento orgânico; TDH: Tempo de detenção hidráulica; SBR: *Sequencing Batch Reactors*

3.3. Referências Bibliográficas

- Aarestrup, F. M., Agerso, Y., Ahrens, P., Jorgensen, J. C. O., Madsen, M. and Jensen, L. B. (2000). Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Veterinary Microbiology*, 74, pp. 353 – 364.
- Anjum, R.; Grohmann, E.; Krakat, N. (2017) Anaerobic digestion of nitrogen rich poultry manure: Impact os thermophilic biogas process on metal release and microbial resistances. *Chemosphere*, 168, pp. 1637-1647.
- ANVISA (2019) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 24/04/2019.
- ANVISA (2018) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5. Acesso em 24/04/2019.
- ARDB (2019) Antibiotic Resistance Genes Database. Disponível em: <https://ardb.cbcb.umd.edu/index.html>. Acesso em 10/03/2019.
- Arias, C. A. and Murray, B. E. (2008). Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert review of anti-infective therapy*, 6(5), pp.637-655.
- Arikan, Osman A. et al. (2006) The Fate and Effect of Oxytetracycline during the Anaerobic Digestion of Manure from Therapeutically Treated Calves. *Process Biochemistry*, 41(7), pp. 1637–43.
- AVIMIG (2019) Associação dos Avicultores de Minas Gerais. Disponível em: www.avimig.com.br. Acesso em 24/04/2019.
- Baeta, B.E.L. et al. (2016) Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 137 – 146.
- Barcellos, D.E., L.E. Razia, and S.M. Borowski (2003) Ocorrência E Identificação de Espiroquetas Intestinais Em Suínos Em Granjas de Porte Industrial. *Ciência Rural*, 33.
- Baptista, Maria Galvão de Figueiredo Mendes (2013) Mecanismo de resistência aos antibióticos. Dissertação - Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa, 2013.
- Beneragama, Nilmini et al. (2013) The Combined Effect of Cefazolin and Oxytertracycline on Biogas Production from Thermophilic Anaerobic Digestion of Dairy Manure. *Bioresource Technology*, 133, pp.23–30.
- Brooks, J.P.; Maxwell, S.L.; Rensing, C.; Gerba, C.P.; Pepper, I.L. (2007) Occurrence of antibioticresistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. *Can J Microbiol*; 53, pp.616–22.
- Burkin M, Galvidis I. (2012) Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay. *Food Chem.* 132, pp.1080-6.
- Chander, Yogesh, Satish C Gupta, Sagar M Goyal, and Kuldip Kumar (2007) Antibiotics: Has the Magic Gone?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(5), pp.739–42.
- Christian, T. et al. (2003) Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Clean–Soil, Air, Water*, 31, pp.36–44.
- Costa, J. C., S. G. Barbosa, M. M. Alves, and D. Z. Sousa (2012) Thermochemical Pre- and Biological

- Co-Treatments to Improve Hydrolysis and Methane Production from Poultry Litter. *Bioresource Technology*, 111, pp.141–47.
- CPVS (2011) Compêndio de Produtos Veterinários. Compêndio de Produtos Veterinários – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/index.html>. Acesso em 05/11/2011.
- CROPLIFE BRASIL. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/conceitos/a-transferencia-de-genes/>. Acesso em 11/05/2021.
- Declour, A., (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *National Institutes of Health*. 1749, pp. 808-816.
- Diarra, M. S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J. and Topp, E. (2010). Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in Enterococcus spp. and Characterization of Isolates from Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp. 8033-8043.
- Dolliver, Holly, Satish Gupta, and Sally Noll. (2008) Antibiotic Degradation during Manure Composting. *Journal of Environment Quality*, 37, pp. 1245.
- Dzidic, S., Suskovic, J., Kos, B., (2008). Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology*. 46, pp.11-21.
- EMBRAPA (2019) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Anuário estatístico da avicultura industrial. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/207603/1/final9340.pdf>. Acesso em 07/04/2021.
- Fang, Hua, Huifang Wang, Lin Cai, and Yunlong Yu. (2015) Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Pathogens in Long-Term Manured Greenhouse Soils As Revealed by Metagenomic Survey. *Environmental Science & Technology* 49, pp.1095–1104.
- FAO (2009) Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome: FAO; 2009.
- Feng, Lu et al. (2017) Removal of Antibiotics during the Anaerobic Digestion of Pig Manure. *Journal of the Total Environment*, 603–604, pp.219–25.
- Forsberg, Kevin J. et al. (2014) Bacterial Phylogeny Structures Soil Resistomes across Habitats. *Nature* 509, pp.612–16.
- Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. (2010) Guia de Antimicrobianos em Veterinária. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Graham, J. P., Evans, S. L., Price, L. B. and Silbergeld, E. K. (2009). Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter. *Environmental Research*, 109, pp. 682 – 689.
- Goldstein, C. et al. (2001) Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 723-726.
- IEA, 2021. Instituto de Economia Agrícola. Preços Médios Mensais no Varejo. Disponível em: http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/precos_medios.aspx?cod_sis=4. Acesso em 11/05/2021.
- Ince, Bahar et al. (2013) Effect of Oxytetracycline on Biogas Production and Active Microbial Populations during Batch Anaerobic Digestion of Cow Manure. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, pp. 541–46.
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y. and Wu, M. (2012). Antibiotic resistance gene

- abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. *Journal of Hazardous Materials*, 235-236, pp.178-185.
- Kanfer I, Skinner MF, Walker RB. (1998) Analysis of macrolide antibiotics. *J Chromatogr A.*, 812(1-2), pp. 255-86.
- Karci, Akin, and Işil Akmeahmet Balcioglu. (2009) Investigation of the Tetracycline, Sulfonamide, and Fluoroquinolone Antimicrobial Compounds in Animal Manure and Agricultural Soils in Turkey. *Science of the Total Environment*, 407, pp. 4652–64.
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., and Virta, M. P. (2018). Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends in microbiology*, 26, pp. 220-228.
- Kelleher, B P et al. (2002) Advances in Poultry Litter Disposal Technology--a Review. *Bioresource Technology*, 83(1), pp. 27–36.
- Kemper, Nicole (2008) Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment. *Ecological Indicators*, 8(1), pp.1–13.
- Khan, A. A., Nawas, M. S., Khan, S. A. and Steele, R. (2002). Detection and characterization of erythromycin-resistant methylase genes in Gram-positive bacteria isolated from poultry litter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, pp.377-381.
- Kim, S.-H., Han, S.-K. and Shin, H.-S. (2006) Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41(1), pp. 199–207.
- Kumar, Ramasamy Rajesh, Jae Taek Lee, and Jae Young Cho (2012) Fate, Occurrence, and Toxicity of Veterinary Antibiotics in Environment. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(6), pp.701–9.
- Kümmerer, Klaus (2009) Antibiotics in the Aquatic Environment - A Review - Part I. *Chemosphere*, 75(4), pp.417–34.
- Lalman, J a, and D M Bagley. (2000) Anaerobic Degradation and Inhibitory Effects. *Water Res*, 34(17), pp.4220–28.
- Leal, Rafael Marques Pereira, Rafael Fernandes Figueira, Valdemar Luiz Tornisielo, and Jussara Borges Regitano. (2012) Occurrence and Sorption of Fluoroquinolones in Poultry Litters and Soils from São Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment*, 432, pp.344–49.
- Leal, C. D., Pereira, A. D., Nunes, F. T., Ferreira, L. O., Coelho, A. C. C., Bicalho, S. K., ... de Araújo, J. C. (2016). Anammox for nitrogen removal from anaerobically pre-treated municipal wastewater: Effect of COD/N ratios on process performance and bacterial community structure. *Bioresource Technology*, 211, 257–266.
- Li, S., Song, W., Zhou, Y., Tang, Y., Gao, Y. and Miao, Z. (2015). Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from a swine farm to the receiving river. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(17), pp.13033-13037.
- Li, H., Duan, M., Gu, J., Zhang, Y., Qian, X., Ma, J., Zhang, R., Wang, X. (2017). Effects of bamboo charcoal on antibiotic resistance genes during chicken manure composting. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, pp.1 – 6.
- Lu, J. Sanchez, S., Hofacre, C., Maurer, J. J., Harmon, B. G., Lee, M. G. (2003). Evaluation of Broiler Litter with Reference to the Microbial Composition as Assessed by Using 16S rRNA and Functional Gene Markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp. 901 – 908.
- Luo, Gang et al. (2017) Antibiotic Resistance Genes and Correlations with Microbial Community and

Metal Resistance Genes in Full-Scale Biogas Reactors As Revealed by Metagenomic Analysis. *Environmental Science & Technology*:

- MAPA (2003) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 09, de 27 de Junho de 2003.
- MAPA (2004) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 24 de Novembro de 2004.
- MAPA (2005) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 35, de 14 de Novembro de 2005.
- MAPA (2007) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 45, de 22 de Março de 2007.
- MAPA (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 09 de Julho de 2009.
- MAPA (2012) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14, de 17 de Maio de 2012.
- MAPA (2016) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45, de 28 de Novembro de 2016.
- MAPA (2017) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Cartilha de prevenção da doença Encefalopatia Espongiforme Bovina - EEB*. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb>.
- MAPA (2018) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 171, de 13 de Dezembro de 2018.
- MAPA (2020) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 01, de 13 de Janeiro de 2020.
- MAPA (2021). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br>. Acesso em 11/05/2021.
- Marchioro, V., Steinmetz, R.L.R., do Amaral, A.C., Gaspareto, T.C., Treichel, H., Kunz, A. (2018) Poultry Litter Solid State Anaerobic Digestion: Effect of Digestate Recirculation Intervals and Substrate/Inoculum Ratios on Process Efficiency. *Front. Sustain. Food Syst.* 2, 1–10.
- Martínez-Carballo, Elena, Carmen González-Barreiro, Sigrid Scharf, and Oliver Gans. (2007) Environmental Monitoring Study of Selected Veterinary Antibiotics in Animal Manure and Soils in Austria. *Environmental Pollution*, 148(2), pp.570–79.
- Massé, D I, F Croteau, L Masse, and S Danesh. (2004) The Effeect of Scale-up on the Digestion of Swine Manure Slurry in Psychrophilic Anaerobic Sequencing Batch Reactors. *Transactions of the ASAE* 47_ (4), pp.1367–73.
- Menten, J.F.M (2001) Aditivos Alternativos Na Nutrição de Aves: Probióticos E Prebióticos. In *Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Piracicaba: SBZ, pp.141–57.
- MERCK (2012) The Merck Veterinary Manual. Macrolides: special clinical concerns. Disponível em: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/191269.htm>. Acesso em 06/01/2012.
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., ... & Alvarez, P. J. J. (2015) Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water research*, 85, 458-466.

- Miah, M.R.; Rahman, A.K.M.L.; Akanda, M.R.; Pulak, A.; Rouf, M.A. (2016) Production of biogas from poultry litter mixed with the co-substrate cow dung. *Journal of Taibah University for Science*, 10, pp. 497-504.
- Mitchell, Shannon M. et al. (2013) The Effects of the Antibiotics Ampicillin, Florfenicol, Sulfamethazine, and Tylosin on Biogas Production and Their Degradation Efficiency during Anaerobic Digestion. *Bioresource Technology*, 149, pp. 244–52.
- Nandi, S., Maurer, J. J., Hofacre, C. and Summers, A. O. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *PNAS*, 101, pp.7118 – 7122, 2004.
- Neihardt, F. (2004). Bacterial genetics. Em McGraw Hill (Eds.), *Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases* (4^a ed., pp. 53 - 74). Nova Iorque.
- Ngbede, E. O., Raji, M. A., Kwanashie, C. N. and Kwaga, J. K. P. (2017). Antimicrobial resistance and virulence profile of enterococci isolated from poultry and cattle sources in Nigeria. *Tropical Animal Health And Production*, 49(3), pp.451-458.
- Novo, A.; Manaia, C.M. (2010) Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal waste water treatment plants. (2010) *Appl Microbiol Biotechnol*; 87(3), pp. 1157–66.
- Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2013) Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research*, 47(5), pp. 1875-1887.
- OIE (2011) World Organization for Animal Health. OIE List of antimicrobials of veterinary importance. Disponível em: http://www.oie.int/doc/en_document.php?numrec=3533703. Acesso em 21/11/2011.
- Ok, Yong Sik et al. (2011) Monitoring of Selected Veterinary Antibiotics in Environmental Compartments near a Composting Facility in Gangwon Province, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174(1–4), pp.693–701.
- Oliveira, Guilherme Henrique Duarte de. (2016) Remoção de Sulfametazina Em Reatores Anaeróbios Tratando Água Residuária de Suinocultura. Tese - Doutorado em Ciências (Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo. São Carlos, 2016.
- OMS (2017). Organização Mundial da Saúde (World Health Organization). Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/antibiotics-animalseffectiveness/en/>. Acesso em 24/04/2019.
- Palermo-Neto, J. et al (2006) Antimicrobianos Como Aditivos Em Animais de Produção. In *Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.641–58.
- Pei, R.; Kim, S.C.; Carlson, K.H.; Pruden, A. (2006) Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*; 40; pp.2427–35.
- Pei, J., Yao, H., Wang, H., Ren, J., & Yu, X. (2016). Comparison of ozone and thermal hydrolysis combined with anaerobic digestion for municipal and pharmaceutical waste sludge with tetracycline resistance genes. *Water research*, 99, 122–128.
- Phillips, I (2003) Does the Use of Antibiotics in Food Animals Pose a Risk to Human Health? A Critical Review of Published Data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), pp.28–52.
- Pinheiro, Adilson et al. (2013) Veterinary Antibiotics and Hormones in Water from Application of Pig Slurry to Soil. *Agricultural Water Management*, 129, pp.1–8.

- Poels, J., P. Van Assche, and W. Verstraete (1984) Effects of Disinfectants and Antibiotics on the Anaerobic Digestion of Piggery Waste. *Agricultural Wastes*, 9(4), pp.239–47.
- PUBCHEM. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tylosin>. Acesso em 24/04/2019.
- Rajagopal, R.; Massè, D.I. (2016) Start-up of dry anaerobic digestion system for processing solid poultry litter using adapted liquid inoculum. *Process Safety and Environmental Protection*, 102, pp. 495-502.
- Regitano, Jussara Borges, and Rafael Marques Pereira Leal (2010) Comportamento E Impacto Ambiental de Antibióticos Na Produção de Animal Brasileira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(3), pp.1–15.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M., Michael, I. and Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 447, pp.345-360.
- Rutz, F., and G. J. M. M. Lima. 2001. O Uso de Antimicrobianos Como Promotores de Crescimento No Brasil. In *Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, Porto Alegre: CNPSA.
- Salyers, A. A. 1999. Agricultural Use of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Human Pathogens: Is There a Link? In *Alltech 'S Annual Symposium*, ed. Alltech. Nottingham, pp. 155–71.
- Sarmah, Ajit K., Michael T. Meyer, and Alistair B.A. Boxall (2006) A Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (VAs) in the Environment. *Chemosphere* 65(5), pp.725–59.
- Schlüsener, M. P.; M. A.; von Arb, and K. Bester. (2006) Elimination of Macrolides, Tiamulin, and Salinomycin During Manure Storage. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(1), pp.21–28.
- Schmitt, Heike et al. (2006) Tetracyclines and Tetracycline Resistance in Agricultural Soils: Microcosm and Field Studies. *Microbial Ecology* 51(3), pp.267–76.
- SEAPA (2020) Secretaria do Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Acesso em 07/04/2020. Disponível em: [http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/avicultura_corte_nov_2020\[1\].pdf](http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/avicultura_corte_nov_2020[1].pdf).
- Servais, P. and Passerat, J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci Total Environ*, 408, pp.365–372.
- Shen, J.; Zhu, J. (2017) Methane production in an upflow anaerobic biofilm digester from leachates derived from poultry litter at different organic loading rates and hydraulic retention times. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, pp. 5124-5130.
- Shi, J. C., X. D. Liao, Y. B. Wu, and J. B. Liang. (2011) Effect of Antibiotics on Methane Arising from Anaerobic Digestion of Pig Manure. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp.457–63.
- Spinoza, H. S.; S. L.; Górnica, and M. M. Bernardi (2006) Antibióticos: Aminoglicosídeos, Polimixinas, Bacitracina E Vancomicina. In *Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária.*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C. and Ploy, M. C. (2014). Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *The ISME Journal*, 8(4), pp.768-777.
- Su, J., An, X., Li, B., Chen, Q., Gillings, M., Chen, H., Zhang, T. and Zhu, Y. (2017). Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China. *Microbiome*, 5(1).

- Sutton, A. L. et al. (1989) Effects of Avilamycin in Swine and Poultry Wastes on Methane Production in Anaerobic Digesters. *Biological Wastes*, 30(1), pp.35–45.
- Thiele-Bruhn, Soren (2003) Pharmaceutical Antibiotic Compounds in Soils—a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 166, pp.145–67.
- UE (1998) União Europeia. Regulamento (CE) no 2821/98 do conselho de 17 de dezembro de 1998. Altera, no que diz respeito à retirada da autorização de certos antibióticos, a Diretiva 70/524/CEE relativa aos aditivos na alimentação para animais. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, n. L351, p. 4-8, 1998.
- van den Bogaard A.E, Willems R., London N., Top J., Stobberingh E.E. (2002) Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother*. 49(3), pp.497-505.
- van Boeckel, Thomas P. et al (2015) Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(18), pp.5649–54.
- Yang, M., Ma, X., Xie, D., Wu, C., Wang, Q., Gao, M., Xu, M., Liu, S. (2020) A study towards minimizing tylosin concentration and antibiotic resistance genes in tylosin fermentation dreg fertilizer. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 104372.
- You, Y., Hilpert, M. and Ward, M. J. (2012). Detection of a Common and Persistent tet(L)-Carrying Plasmid in Chicken-Waste-Impacted Farm Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, pp.3203 – 3213.
- Yuan, Qing-Bin; Guo, Mei-Ting; Yang, Jian. (2015) Fate of antibiotic resistant bacteria and genes during wastewater chlorination: implication for antibiotic resistance control. *PLoS one*, v. 10, n. 3, p. e0119403.
- Zhang, H.M., M.K. Zhang, and G.P. Gu (2008) Residues of Tetracyclines in Livestock and Poultry Manures and Agricultural Soils from North Zhejiang Province. *J Ecol Rural Environ*, 24, pp.69–73.
- Zhang, Y., Li, H., Gu, J., Qian, X., Yin, Y., Li, Y., Zhang, R., Wang, X. (2016). Effects of adding different surfactants on antibiotic resistance genes and intI1 during chicken manure composting. *Bioresource Technology*, 219, pp.545 – 551.
- Zhao, Ling, Yuan Hua Dong, and Hui Wang (2010) Residues of Veterinary Antibiotics in Manures from Feedlot Livestock in Eight Provinces of China. *Science of the Total Environment*, 408(5), pp.1069–75.
- Zhen, G., Lu, X., Kato, H., Zhao, Y., Li, Y.Y., 2017. Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev*. 69, 559–577.
- Zhi, S., Zhang, K. Antibiotic residues may stimulate or suppress methane yield and microbial activity during high-solid anaerobic digestion. *Chem. Eng. J*. 359, 1303 – 1315, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.050>
- Zhu, Yong-Guan et al. (2013) Diverse and Abundant Antibiotic Resistance Genes in Chinese Swine Farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(9), pp. 3435–40.

4. JUSTIFICATIVA DA PESQUISA E ORGANIZAÇÃO DA TESE

A geração e disseminação, cada vez mais frequente e descontrolada, de bactérias resistentes a antibióticos, têm agravado os quadros clínicos e dificultado o tratamento de enfermidades, se tornando um problema de Saúde Pública. Sabe-se, atualmente, que uma das principais formas de disseminação dos agentes seletores de resistência antimicrobiana (antibióticos, bactérias e genes) é o uso indiscriminado de antibióticos veterinários em animais produtores de alimento. A contínua inserção desses compostos no organismo animal, durante o tratamento terapêutico, seleciona bactérias resistentes que, por sua vez, são difundidas para o meio ambiente pelos próprios excrementos animais, seja via escoamento superficial ou na aplicação do esterco como fertilizante.

Esta tese teve o propósito de avaliar se houve redução e/ou degradação desses agentes seletores de resistência antimicrobiana, quando a cama de aviário – principal resíduo da avicultura – foi submetida à digestão anaeróbia, combinada ou não com o pré-tratamento hidrotérmico do resíduo. A escolha pela digestão anaeróbia se deve ao fato de a cama de aviário conter elevado conteúdo orgânico e nutricional, ou seja, tem potencial para geração de metano, cuja sustentabilidade energética (quando combinada com o pré-tratamento hidrotérmico), também foi avaliada neste trabalho.

Diante disso, o fluxograma das principais atividades executadas nesta pesquisa (Figura 4.1) foi organizado em consonância com objetivos propostos para avaliar a hipótese geral da tese (ver item 2). Em função da grande variedade de metodologias e resultados, a tese foi estruturada na forma de artigos, que apresentam separadamente os resultados obtidos em cada etapa descrita na Figura 4.1.

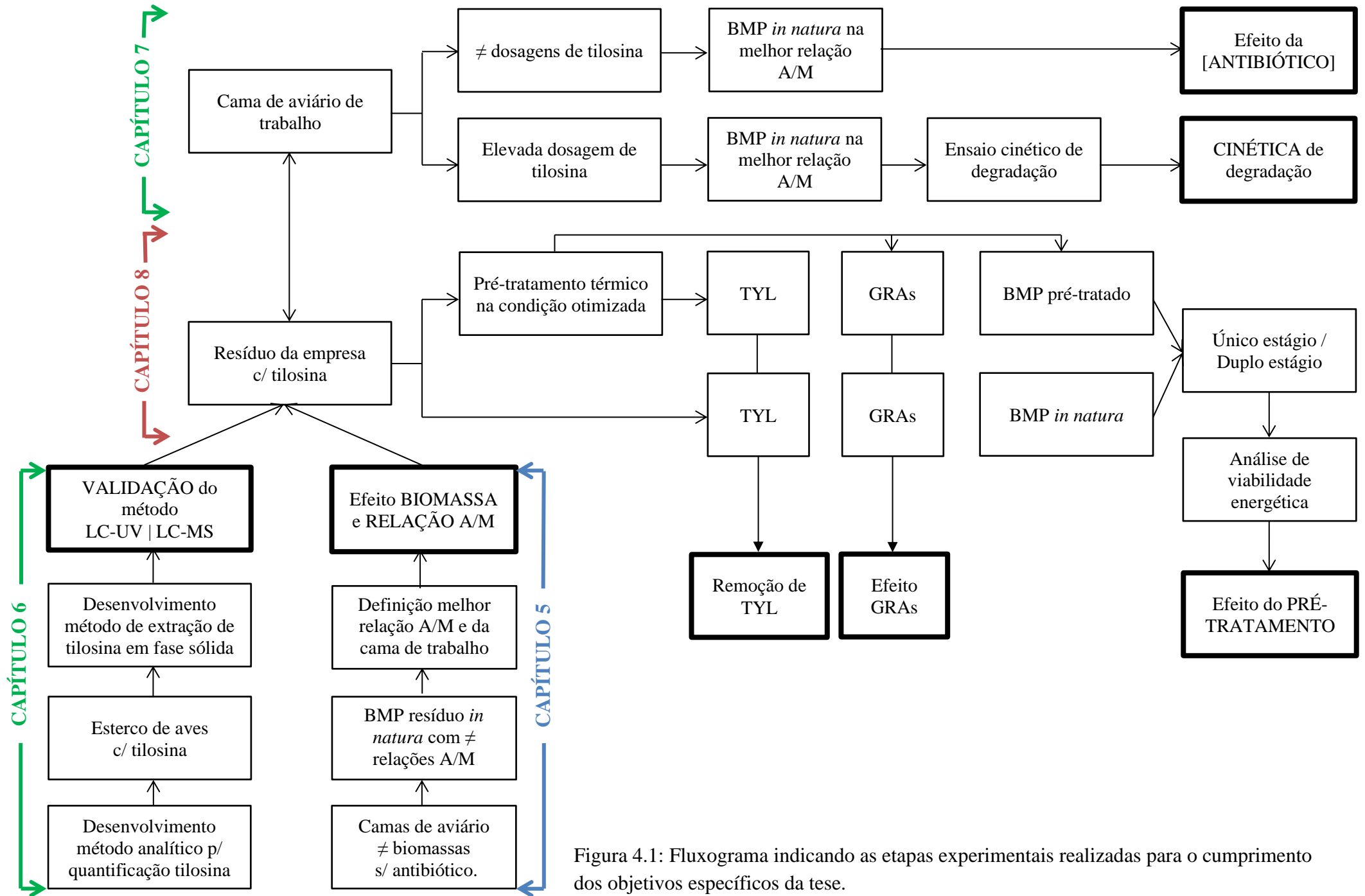


Figura 4.1: Fluxograma indicando as etapas experimentais realizadas para o cumprimento dos objetivos específicos da tese.

5. PRODUÇÃO DE METANO PELA CO-DIGESTÃO DE ESTERCO DE AVES E BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: AVALIAÇÃO CINÉTICA E ENERGÉTICA¹

Resumo: Seis diferentes biomassas lignocelulósicas (palha de arroz, sabugo de milho, casca de amendoim, serragem, casca de café e bagaço de cana-de-açúcar), tipicamente brasileiras, foram avaliadas quanto à produção de metano por co-digestão anaeróbia em fase sólida com excreta de aves. Os resultados mostraram que a maior produção de metano foi obtida com sabugo de milho e esterco de aves ($126,02 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{ton}_{\text{resíduo}}^{-1}$) usando a relação alimento/microrganismo de 0,5, na qual houve o menor acúmulo de ácidos graxos voláteis totais. Nessa condição, a produção de energia térmica ($1,73 \text{ MJ} \cdot \text{kg ave viva}^{-1}$) foi capaz de substituir 53,2% da energia gasta com lenha em uma típica granja. O alto conteúdo de hemicelulose e baixo teor de lignina presente no sabugo de milho parecem explicar a biometanização dessa biomassa, o que concorda com a análise microbiana que revelou a predominância de bactérias relacionadas à hidrólise de polissacarídeos de plantas e a conversão de carboidratos, no inóculo. A produção de metano foi melhor modelada pelo modelo de multi-estágios de Groot's, e a adaptação microbiana à lignina pode explicar isso.

Palavras-chave: Fermentação em fase sólida, co-digestão anaeróbia, esterco de aves, biomassa lignocelulósica.

5.1. Introdução

A produção de frango é uma das atividades mais expressivas do agronegócio brasileiro, visto que o país ocupa a primeira posição no ranking de exportações de carne de frango, seguido por carne bovina (2º) e por carne suína (4º) (EMBRAPA, 2019). Em 2017, 6,2 bilhões de aves foram produzidas e cerca de 230 milhões de toneladas de esterco de aves (EA) foram gerados (AVIMIG, 2019). Esse resíduo, por sua vez, era geralmente utilizado para a alimentação de ruminantes até 2004, quando essa prática foi proibida no Brasil (Instrução Normativa MAPA nº 08, de 25/03/2004) para prevenir a ocorrência da “doença da vaca louca” – Encefalopatia Espongiforme Bovina (EBB) – nos bovinos e até mesmo no homem. Diante disso, o resíduo passou a ser utilizado como fertilizante orgânico devido ao alto conteúdo nutricional, como nitrogênio, fósforo e potássio (Rahman et al., 2017). No entanto, a aplicação de dejetos no solo não é sustentável a longo prazo, ocasionando problemas ambientais como a deterioração da

¹ O conteúdo deste capítulo foi publicado como: ‘PARANHOS, A.G.O. ADARME, O.F.H., BARRETO, G.F., SILVA, S.Q., AQUINO, S.F. Bioresource Technology 300 (2020) 122588. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122588

qualidade do solo e da água, devido à sua contaminação por produtos químicos utilizados no processo e por microrganismos patogênicos (Rahman et al., 2017).

Devido ao seu alto conteúdo orgânico, uma alternativa promissora para o manejo do esterco de aves é a sua utilização como matéria-prima para a produção anaeróbia de energia (biogás) anterior à sua aplicação no solo para a ciclagem de nutrientes, visto o elevado conteúdo orgânico (Costa et al., 2012). No entanto, os estercos animais dificilmente podem ser digeridos como única matéria-prima devido ao seu alto conteúdo de amônia que causa inibição e até mesmo o colapso do reator em alguns casos, devido à produção excessiva de AGVs e desequilíbrio do processo (Souto et al., 2009). Os percalços derivados da mono-digestão do esterco podem ser resolvidos pela co-digestão com biomassas com baixo teor de nitrogênio, de modo a fornecer uma relação C/N ideal para a digestão anaeróbia. Materiais lignocelulósicos, incluindo resíduos agrícolas, são potenciais candidatos para compensar a deficiência de carbono do esterco animal, pois contêm alto teor de carbono e baixo teor em nitrogênio, proporcionando um equilíbrio na relação C/N para a digestão anaeróbia desses materiais (Li et al., 2016; Neshat et al., 2017).

A digestão anaeróbia em fase sólida (SS-AD), também conhecida como digestão seca e/ou fermentação seca, tem a vantagem de operar com alta carga de sólidos totais (TS = 15 – 40%), permitindo uma larga capacidade de tratamento de resíduos, mantendo assim boas taxas de degradação e alta produção de biogás, com baixa geração de efluentes (Pandey et al., 2000; Lima et al., 2018).

No contexto da avicultura, o tipo de material lignocelulósico usado como cama de aviário nas granjas, influencia diretamente a cinética do processo SS-AD, uma vez que a presença de alto teores de lignina na biomassa pode exercer um efeito recalcitrante nos microrganismos anaeróbios (Himmel et al., 2007) e serve como barreira para o ataque microbiano na fração holocelulósica (Chang & Holtzaple, 2000). Isso prejudica as taxas de hidrólise dos polissacarídeos com consequente aumento da fase lag, a qual é a etapa limitante do processo SS-AD em resíduos lignocelulósicos (Bassani et al., 2015).

Portanto, o presente trabalho visa avaliar a co-digestão anaeróbia em fase sólida (TS=15%) de excreta de aves e seis diferentes materiais lignocelulósicos comumente utilizados como cama de aviário em granjas no Brasil. A produção de metano via co-digestão em SS-AD foi avaliada em três razões A/M e a viabilidade do processo com diferentes composições da biomassa foi investigado pela análise cinética. Além disso, a análise energética foi realizada para avaliar a sustentabilidade do processo de co-digestão entre esterco de aves e biomassa

lignocelulósica, e a caracterização metagenômica do esterco visou avaliar a adaptabilidade do inóculo utilizado no processo.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. *Materiais e reagentes*

Os materiais lignocelulósicos palha de arroz, sabugo de milho moído, casca de amendoim e serragem foram gentilmente cedidos pela empresa Avivar Alimentos, localizada no município de São Sebastião do Oeste/MG. O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Usina de Álcool e Açúcar Jatiboca, localizada no município de Ponte Nova/MG. A casca de café foi cedida pela Fazenda Jangada, localizada no distrito de Criminoso, no município de Lavras/MG. Todos os materiais foram secos sob luz solar e armazenados em local com baixa umidade.

Mistura equimolar de grau analítico contendo metano, hidrogênio, gás carbônico e nitrogênio foi obtida pela Oximil. Ácido sulfúrico (95–98% and 99.999%) foi adquirido pela Synth (Brazil) e Sigma-Aldrich (Brazil). Cicloexano e etanol (99.5%) foram obtidos pela Synth (Brazil). Padrões cromatográficos de celobiose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e ácido isobutírico, ácido valérico e ácido isovalérico, 5-hidroxi metil-2-furfuraldeído (HMF) e 2-furfuraldeído (FF) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Brazil).

5.2.2. *Caracterização dos materiais lignocelulósicos*

A determinação dos teores de umidade das amostras dos materiais lignocelulósicos utilizados nesse trabalho foi realizada em balança medidora de umidade (Ohaus MB25). O teor de inorgânicos das amostras dos resíduos foi determinado segundo o método “Ash in wood, Pulp, paper and paperboard - TAPPI T211 om-02” e o teor de extrativos segundo o método “Solvent extractives of wood and Pulp - TAPPI T204 cm-97”. Em todas as biomassas lignocelulósicas, o teor de lignina foi determinada pela medida da quantidade de lignina Klason insolúvel de acordo com o método “Determination of acid-insoluble lignin in biomass - TAPPI T222 om-98”. O teor de lignina solúvel em ácido foi determinada com um espectrômetro UV-Vis (Hewlett-Packard®, modelo 8453), enquanto os teores de celulose e hemiceluloses foram determinados por análise cromatográfica (CLAE) dos componentes da solução resultante da determinação de lignina pelo método Klason.

A concentração dos açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ácidos orgânicos (fórmico e acético) e produtos de degradação dos açúcares (2-furfuraldeído e 5-hidroxi metil-2-

furfuraldeído (HMF)), foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um HPLC (Shimadzu), equipado com coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm BIO-RAD), mantida a 45°C (Shimadzu, modelo CTO-30A), usando um detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-6A) para açúcares, e um detector UV-Vis (Shimadzu, modelo SPD-10AV) nos comprimentos de onda de 210nm e 274nm, para ácidos orgânicos e produtos de degradação de açúcares, respectivamente. Ácido sulfúrico (5 mmol.L⁻¹) foi utilizado como eluente, na vazão de 0,6 mL.min⁻¹. A massa de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação de açúcares foram usados para calcular o teor de celulose e hemicelulose na fração sólida, cujos coeficientes de conversão são descritos por Lima et al. (2018).

5.2.3. Caracterização metagenômica da excreta de aves

A extração do DNA da amostra de excreta de aves foi realizada com o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®), seguindo o protocolo recomendado. A quantificação do DNA foi realizada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fischer Scientific) no intervalo recomendado para o comprimento de onda A260/A280 nm. Posteriormente, o gene para o DNA ribossomal 16S (16S rDNA) foi parcialmente amplificado via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os seguintes oligonucleotídeos universais PF: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA e PR: CCGTCAATTTYTTTTRAGTTT (Fouhy et al., 2016) para amplificar a região V4 – V5. A PCR foi realizada em 30 µL de volume contendo 3 µL de tampão (10x, Kapa Biosystems); 1.13 µL de dNTP (10 mM, Kapa Biosystems); 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM, Kapa Biosystems); 4.5 µL de cada oligonucleotídeo (1 µM, Kapa Biosystems), 20 ng do template do DNA e 0.48 µL da enzima Platinum® Taq (Invitro gen) (5U/ µL). As reações foram realizadas em um termociclador (Biocycler®) com inicialmente 5 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 57°C e 1 min a 72°C, e a extensão final em 5 min a 72°C. Os amplicons foram então purificados usando um kit de purificação para PCR (QIAquick®) de acordo com as instruções do fabricante e a sua integridade foi avaliada pela eletroforese em gel de agarose. O amplicon de DNA purificado foi quantificado usando o kit Qubit dsDNA HS™ (Alta Sensitividade) no fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, USA) e então, as amostras foram normalizadas para 70 pM. Finalmente, 25 µL do amplicon do DNA foi carregado em um chip 318 v2 (Life Technologies, USA) e corrido na plataforma NGS Ion PGM (Life Technologies, USA). As sequências foram analisadas no software Ion Reporter™ (Thermo Fischer Scientific).

A análise funcional preditiva KEGG foi realizada usando a plataforma KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) para investigar as principais vias metabólicas e propriedades dos táxons mais abundantes encontrados em amostras de dejetos de aves.

5.2.4. Preparação do inóculo e dos substratos

As excretas de aves utilizados nesse trabalho são provenientes de galinhas poedeiras domésticas, alimentadas com ração e milho triturado. O inóculo para os testes de produção de CH₄ é constituído por 50% (em termos SV) de excretas de galinhas poedeiras domésticas e 50% (em SV) de lodo anaeróbio de reator UASB alimentado com esgoto sanitário e operado em escala de demonstração no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG-COPASA, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Arrudas, na cidade de Belo Horizonte/MG.

Testes preliminares mostraram que a mistura constituída por excretas de galinhas (50% SSV) e lodo UASB (50% SSV) mantida em pH 9,0, resultou nas maiores produções de metano, quando comparada com outros valores de pH (7,0 e 8,0) e com outros inóculos (100% dejetos de galinhas e 100% lodo UASB). Esses resultados estão apresentados na Figura 5.1S do Anexo (item 5.6). Por esse motivo, o inóculo foi incubado em pH 9,0, temperatura de 35°C e agitação constante (180 rpm), em incubadora shaker (Thoth, modelo 6440) por no mínimo 20 dias para a adaptação da biomassa microbiana.

Os substratos utilizados nesse trabalho são constituídos por uma mistura dos materiais lignocelulósicos comumente utilizados como cama de aviário no país (RS – palha de arroz, CC – sabugo de milho, PS – casca de amendoim, SW – serragem, CH – casca de café e SB – bagaço de cana-de-açúcar) com a excreta de galinhas poedeiras domésticas (EA), em uma razão de 1:5 (em massa), a qual é a razão geralmente encontrada no resíduo avícola de empresas produtoras de frango de corte.

5.2.5. Experimentos de produção de metano

Os experimentos de co-digestão anaeróbia em fase sólida (SS-AD), entre excreta de galinhas e resíduos lignocelulósicos, foram realizados em frascos de vidro transparente de 120 mL (reatores em batelada), em que 50% do volume foi reservado para o volume útil e os outros 50% ao *headspace*. Os frascos foram preenchidos com o substrato e inóculo, de forma a manter a relação substrato-inóculo (A/M) a ser testada (0,5, 2 e 4 g SV_{substrato} · g SV_{inóculo}⁻¹), e teor de sólidos totais (ST) igual a 15%. Para cada condição, os experimentos foram conduzidos em duplicata acrescido do frasco controle. O frasco controle não foi carregado com substratos,

permitindo então a avaliação de qualquer atividade metanogênica associada com a degradação da matéria orgânica presente no inóculo ou por decaimento endógeno (Figura 5.1S, do Anexo – item 5.6).

Em todos os frascos, o pH inicial foi ajustado em aproximadamente 9,0 utilizando NaOH (1,0 M) e gás N₂ foi purgado de forma a manter a anaerobiose do sistema. Os frascos foram incubados em incubadora shaker (Thoth, modelo 6440) e mantidos a temperatura e agitação constantes (180 rpm e 35°C).

A quantificação de biogás produzido durante a SS-AD foi monitorada a cada 12h nos primeiros 20 dias e a cada 24h até a estabilização da produção, registrando-se a pressão acumulada nos frascos (Manômetro, modelo PM-9100HA). A composição do biogás, em termos de metano (% v.v⁻¹), foi determinada por um cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo GC 2014), equipado com um detector de condutividade térmica, sob condições descritas por Lima et al. (2018). Todos os experimentos foram monitorados por 60 dias e todos os valores de produção de metano foram expressos em NLCH₄.kgSV⁻¹, considerando as condições padrão de temperatura e pressão (273,15 K e 101,315 Pa) conforme recomendado pela União Internacional de Química Pura Aplicada (IUPAC).

5.2.6. Modelagem dos dados experimentais

O modelo de Gompertz modificado é um modelo empírico que permite a determinação de importantes parâmetros de digestão anaeróbia, como fase *lag*, taxa de produção específica de metano e produção máxima acumulada de metano (Zwietering et al., 1990). Nesse trabalho, o modelo Gompertz modificado, descrito pela Eq. (5.1), foi utilizado para modelar os dados obtidos a partir dos experimentos de SS-AD.

$$P = P_0 \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m e}{P_0} (\lambda - 1) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. (5.1)}$$

Em que P é o potencial de produção de metano (NL CH₄. kg SV⁻¹), μ_m é o taxa máxima de produção de metano (NL CH₄. kg SV⁻¹dia⁻¹), λ é o tempo de fase *lag* (dias) e e é o número de Euler.

O modelo de multi-estágios (Eq. 5.2) proposto por Groot et al. (1996), cujos resultados são obtidos considerando duas ou mais (até n) curvas sigmoidais, descreve a cinética de estágios distintos nos perfis de produção de biogás.

$$P = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{1 + \frac{B_i}{t^{C_i}}} \quad \text{Eq. (5.2)}$$

Neste modelo, P (NL CH₄. kg VS⁻¹) denota a quantidade de gás produzida no tempo t (dia) após a incubação; A_i (NL CH₄. Kg VS⁻¹) representa a produção assintótica de gás para a fase i ; B_i (dia) é o tempo após a incubação em que metade da quantidade assintótica de gás foi formada para a fase i ; e C_i é uma constante que determina a nitidez da característica de comutação do perfil de fase i . O valor de i indica o número de fases (de 1 a n) (López et al., 2010).

O ajuste do modelo Gompertz modificado e de Groot's aos dados experimentais de produção de metano por SS-AD, a partir de diferentes substratos, foi feito usando o software Statistica 10.0 (StatSoft Inc. 2010, USA). A partir do ajuste do modelo, as seguintes funções de erro foram obtidas em ordem de selecionar e validar o melhor modelo (Lima et al., 2018): coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro quadrático médio (RMSE), raiz do erro quadrático médio normalizada (NRMSE) e critério de informação de Akaike (AIC).

5.2.7. Caracterização das frações líquidas e sólidas

As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). As análises de Carbono Orgânico Total (COT) foram realizadas por um Analisador de Carbono e Nitrogênio Total (TOC TN Shimadzu). O Nitrogênio Amoniacal Total (TAN) foi determinado por um cromatógrafo de íons (Methrom), equipado com amostrador automático, detector de condutividade e coluna Metrosep C4-150/4.0 mantida a 30°C. Solução de ácido nítrico (1,70 mmol.L⁻¹) e ácido dipicolínico (0,70 mmol.L⁻¹) foram utilizados como eluentes sob um fluxo constante de 0,9 mL.min⁻¹.

Após a estabilização da produção de metano nos ensaios de SS-AD, os frascos eram abertos para a medida do pH final e o conteúdo do frasco era centrifugado para remoção dos sólidos suspensos (Microcentrífuga Herolab 14800 rpm). O sobrenadante era filtrado em membrana de acetato de celulose (Sartorius - 0,45 µm) e diluído 5 vezes para análise de AGVs, 10 vezes para análise de DQO e 100 vezes para análise de TAN. O sólido centrifugado era lavado em uma peneira de 14 mesh, para separação do material lignocelulósico e posterior análise do conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina residual, conforme metodologia Klason. Os AGVs produzidos durante a SS-AD foram identificados e quantificados em HPLC Shimadzu de acordo com a metodologia para análise de ácidos orgânicos descrita anteriormente.

5.2.8. Estimativa do balanço energético para produção de metano em SS-AD

Os balanços de energia para as melhores condições foram calculados considerando a quantidade de energia consumida durante a purificação do biogás e a energia obtida nos testes experimentais de SS-AD. Usando o rendimento de metano dos ensaios experimentais de BMP, foi possível estimar a produção de energia por kg de frango (E_P) de acordo com a Eq. (5.3).

$$E_P = BMP \times \frac{TVS}{Ton\ Waste} \times \frac{54\ Ton\ Waste}{1\ cycle} \times \frac{1\ cycle}{30000\ chicken} \times \frac{1\ chicken}{2.5\ kg} \times 34.5\ MJ\ Nm^3\ CH_4^{-1} \quad Eq.(5.3)$$

Em que BMP ($Nm^3\ CH_4\ kg\ VS^{-1}$) é a produção acumulada final de metano, TVS é a quantidade de sólidos voláteis totais obtidas por tonelada de resíduo (biomassa lignocelulósica + esterco de aves), em base de massa seca.

A eletricidade consumida para a purificação de biogás (E_{biogas}) foi estimada como 10% da eletricidade total produzida por cogeração, como descrito por Mainardis et al. (2019). Considerando eficiências típicas para um sistema CHP, a E_P foi convertida em energias térmica (E_T) e elétrica (E_E) de acordo com as equações (5.4) e (5.5).

$$E_T = E_P \times 0.85 \times 0.66 \quad Eq. (5.4)$$

$$E_E = E_P \times 0.85 \times 0.33 \quad Eq. (5.5)$$

Em que 0,85 é a eficiência do motor de combustão; 0,66 é o fator de conversão da E_P para E_T , e 0,33 é o fator de conversão da E_P para E_E (Cano et al., 2015).

No sentido de estimar a rentabilidade energética ($MJ.kg\ ave^{-1}$ (térmica) e $kWh.kg\ ave^{-1}$ (elétrica)) do processo global, a diferença entre a energia consumida na purificação do biogás e a energia gerada em SS-AD (E_T e E_E) também foi avaliada.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Caracterização química dos materiais lignocelulósicos, inóculo e substratos

A Tabela 5.1 mostra a caracterização das seis biomassas lignocelulósicas utilizadas nesse trabalho como substratos. Por meio desta, ressalta-se a grande diferença dentre as biomassas estudadas, principalmente em função dos percentuais de seus constituintes - celulose, hemicelulose e lignina. Percebe-se que o sabugo de milho, serragem e bagaço de cana possuem os mais altos teores de celulose. O sabugo de milho possui o menor teor de lignina e mais

elevado teor de hemicelulose dentre as biomassas avaliadas, enquanto a serragem possui o segundo menor teor de hemicelulose. A composição encontrada para a palha de arroz, sabugo de milho, casca de amendoim, serragem, casca de café e bagaço de cana-de-açúcar é similar aos valores encontrados por Teramura et al. (2013), Szyszkowska et al. (2007), Dahunsi et al. (2017), Szezodrak et al. (1985), Baêta et al. (2017) e Lima et al., (2018), respectivamente.

A Tabela 5.2 mostra a caracterização do inóculo e dos substratos utilizados nos ensaios de BMP em função dos teores de sólidos (SV e ST), carbono orgânico total (COT), nitrogênio total Kjeldahl (NTK) e da relação C/N. A relação C/N é um importante parâmetro no processo de co-digestão. A Tabela 2 mostra que a razão C/N aplicada para cada condição de co-digestão variou de 16 a 25. Em monodigestão de excreta de aves, a razão C/N foi de 7,85, a qual é relativamente baixa quando comparada com todas as condições de co-digestão testadas, e isso pode refletir o baixo teor de carbono e alto teor de nitrogênio da excreta de aves. Tong et al. (2014) e Zhang et al. (2013) encontraram resultados similares aos apresentados nesse estudo, e definiram que a razão C/N ótima para codigestão anaeróbia de excreta de aves e resíduos agroindustriais variam entre 15 – 25, e para esterco bovino e resíduo alimentar é de 15,8. Em contraste, Rahman et al. (2017) definiram o intervalo de 30 – 33 como ideal para a co-digestão de excreta de aves e palha de trigo ou grama.

Tabela 5.1: Caracterização das biomassas lignocelulósicas

Parâmetros	PA	SM	CA	SE	CC	BC
ST (%)	89,4 ± 0,2	87,0 ± 0,2	89,4 ± 0,2	83,7 ± 0,3	90,3 ± 0,4	87,7 ± 0,7
SV (%)	74,2 ± 0,7	85,3 ± 0,1	89,3 ± 0,1	83,1 ± 0,3	84,8 ± 1,0	81,0 ± 0,8
COT (%)	41,0	44,0	47,0	45,0	44,0	44,0
Cinzas (%)	15,9	2,1	1,5	0,4	4,1	1,5
Extrativos (%)	2,6	10,5	8,5	10,4	16,0	2,2
Celulose (%)	39,1	42,9	31,9	49,4	36,0	44,2
Hemicelulose (%)	17,5	31,6	12,6	14,2	29,4	23,6
Lignina Klason (%)	28,6	18,7	50,7	39,6	31,1	25,8

ST - Sólidos totais; SV - Sólidos voláteis; COT - Carbono orgânico total; PA – palha de arroz; SM – sabugo de milho; CA – casca de amendoim; SE – serragem; CC – casca de café; BC – bagaço de cana.

Tabela 5.2: Caracterização do inóculo e substratos usados na co-digestão

Parâmetros	Inóculo	EA	PA:EA	SM:EA	CA:EA	SE:EA	CC:EA	BC:EA
pH	8,95	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
ST (%)	20,7 ± 0,2	87,4 ± 0,2	88,2 ± 0,4	87,9 ± 0,7	89,0 ± 0,8	87,4 ± 0,2	87,0 ± 0,4	88,0 ± 0,4
SV (%)	10,6 ± 0,1	32,7 ± 0,3	41,1 ± 2,2	44,3 ± 4,8	41,1 ± 3,0	42,5 ± 0,1	44,4 ± 1,8	43,4 ± 1,8
COT (%)	nm	12,0	20,0	19,0	22,0	19,0	19,0	21,0
NTK (%)	0,66	1,47	0,79	1,03	1,31	1,05	1,12	1,03
C/N	-	7,85 ± 0,18	24,77 ± 0,18	18,33 ± 0,04	16,64 ± 0,12	17,66 ± 0,05	16,59 ± 0,06	20,41 ± 0,19

nm – não medido; EA – excreta de aves; PA:EA – palha de arroz e esterco de aves, SM:EA – sabugo de milho e esterco de aves, CA:EA – casca de amendoim e esterco de aves, SE:EA – serragem e esterco de aves, CC:EA – casca de café e esterco de aves, BC:EA – bagaço de cana e esterco de aves.

5.3.2. Caracterização da comunidade bacteriana na excreta de aves

A comunidade microbiana presente na excreta de aves usada como substratos (monodigestão e mistura de co-digestão) e como inóculo (em mistura com o lodo UASB), foi investigada para identificar os microrganismos potencialmente envolvidos na co-digestão anaeróbia em fase sólida. Para a análise microbiana, foram usadas 15710 leituras por amostra, na qual foi suficiente para explicar a complexidade do microbioma anaeróbio.

A Figura 1 mostra que *Firmicutes* (43%), *Bacteroidetes* (37%) e *Proteobacteria* (20%) são os mais abundantes filos presentes na excreta de aves utilizada. Esses filos são tipicamente detectados em processos anaeróbios, por serem capazes de hidrolizar carboidratos e proteínas e também exercem uma função significativa na degradação de AGVs (Bassani et al., 2015). Devido à relevância dos filos mais abundantes, sua composição em níveis taxonômicos inferiores foi investigada, como destacado na Figura 5.1.

O filo *Firmicutes* (Figura 1) foi principalmente representado pela classe taxonômica *Bacilli* (100% do filo), no qual as ordens *Lactobacillales* e *Bacillales* representam 68% e 32% do filo, respectivamente. Esse táxon é comumente encontrado nos sistemas digestivo e gastrointestinal de animais e está principalmente envolvido na hidrólise de polissacarídeos de plantas e na conversão de carboidratos (como frutose, maltose, lactose e galactose) em acetato, etanol ou uma mistura de AGVs sob condições anaeróbias (Wirth et al., 2012). O filo *Bacteroidetes* é dominado pelas duas principais ordens, *Flavobacteriales* (89%) e *Sphingobacteriales* (9%), enquanto a ordem *Bacteroidales* representa apenas 2% do filo (Figura 1). As espécies pertencentes ao filo *Bacteroidetes* são bem conhecidas por seu envolvimento na degradação de proteínas (Kindaichi et al., 2004). A maioria dos microrganismos proteolíticos é capaz de metabolizar aminoácidos para produzir NH₃ e AGV, como acetato, propionato e

succinato (Rivière et al., 2009). Particularmente, a ordem *Flavobacteriales* foi encontrada em digestores anaeróbios tratando águas residuárias com alto teor de nitrogênio, e isso se deve à sua capacidade de crescer em altas concentrações de amônia (Guo et al., 2015). Quanto ao filo *Proteobacteria*, é representado pelas classes taxonômicas *Betaproteobacteria* (80%) e *Gammaproteobacteria* (15%), enquanto *Deltaproteobacteria* representa apenas 5% do filo. Cada uma das três classes mais abundantes são representadas principalmente por uma única ordem (*Burkholderiales*, *Xanthomonadales* e *Myxococcales*) (Fig. 5.1).



Figura 5.1: Abundância relativa dos filios Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes sob os níveis de classe, ordem e família, na excreta de aves.

Esses resultados taxonômicos evidenciaram que os principais filios presentes nas excretas das aves estão relacionados à degradação de matéria orgânica mais complexa como proteínas e carboidratos, que são posteriormente fermentados em ácidos acético, propiônico, butírico e iso-valérico como produtos principais.

A atribuição taxonômica em OTUs das famílias que tiveram abundância relativa superior a 1% também é relatada na Fig. 5.1. A família mais abundante (*Flavobacteriaceae*) representa 33% do domínio total de bactérias encontradas na amostra de excreta de aves. Os

membros desta família são encontrados em uma ampla variedade de habitats marinhos, de água doce e de solo, e alguns também estão associados a animais ou plantas. A utilização de macromoléculas como polissacarídeos e proteínas é uma característica comum de muitos membros da família *Flavobacteriaceae* (McBride, 2014). As seguintes famílias mais abundantes são *Carnobacteriaceae* (26%), *Alcaligenaceae* (16%) e *Bacillaceae* (14%), que juntas representam 56% do domínio de bactérias para a amostra de excreta de aves. Em ordem decrescente de abundância, pode-se notar a presença de OTUs atribuídas à família *Xanthomonadaceae* (3%), *Saprospiraceae* (3%), *Anaeromyxobacteraceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Aerococcaceae* e *Marinilabiliaceae* com 1% cada uma.

A análise funcional preditiva KEGG foi cuidadosamente aplicada para investigar as vias metabólicas e as propriedades dos táxons mais abundantes anteriormente atribuídos ao nível de família. Como esperado, a análise KEGG reforça as funções associadas à conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis (glicose, xilose, arabinose) durante a digestão anaeróbia em estado sólido.

A grande maioria das famílias encontradas em amostras de excretas de aves (*Flavobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Bacillaceae* e *Xanthomonadaceae*) está envolvida na conversão de polissacarídeos em D-glicose. Por exemplo, as famílias *Flavobacteriaceae* e *Xanthomonadaceae* possuem a enzima β -glucosidase, capaz de converter a celobiose e β -D-glicosídeo em D-glicose, indicando a degradação da fração celulósica do material lignocelulósico. Além disso, membros da família *Flavobacteriaceae* desempenharam um papel importante na degradação da fração hemicelulósica, dada a presença da enzima α -L-arabinofuranosidase, que converte arabinanos em L-arabinose, e enzima 1,4- β -xilosidase, que converte 1,4- β -xilano em D-xilose.

A fração amido, presente principalmente no sabugo de milho (CC) e palha de arroz (RS), foi possivelmente degradada por ação simbiótica entre as famílias *Flavobacteriaceae* (33%), *Alcaligenaceae* (16%) e *Aerococcaceae* (1%). As famílias *Flavobacteriaceae* e *Aerococcaceae* possivelmente atuaram na conversão de maltodextrina em maltose e amido em dextrina / maltose pela enzima α -amilase. Enquanto isso, os membros das famílias *Flavobacteriaceae* e *Alcaligenaceae* atuaram na conversão de amido / dextrina em D-glicose por meio da enzima α -glicosidase.

A análise do KEGG confirmou a capacidade das famílias mais abundantes de fermentar carboidratos e proteínas, uma propriedade funcional evidenciada pela presença de glicosidases, xilosidases, amilases e proteases. Devido à alta concentração de proteína no esterco ($9,22 \pm 1,16\%$), espera-se que as vias de aminoácidos sejam disseminadas nos táxons mais abundantes.

Como exemplo, a reação de Stickland, que envolve oxidação e redução acopladas de aminoácidos em ácidos orgânicos, foi identificada na conversão de serina em acetato na maioria das famílias presentes, e na conversão de D-alanina em acetato apenas para o gênero *Virgibacillus*.

Conforme mostrado na Fig. 5.1, microrganismos metanogênicos não foram encontrados na amostra de excreta de aves. Essa deficiência foi suprida com o uso de lodo UASB na composição do inóculo, conforme descrito por Cardinali-Rezende et al. (2013).

5.3.3. *Influência da relação A/M na produção de metano por SS-AD*

Os ensaios de co-digestão das seis biomassas lignocelulósicas com excreta de aves foram comparados com a digestão apenas da excreta de aves (EA). De modo a avaliar a influência das diferentes biomassas lignocelulósicas e da relação A/M sob a produção de metano, os experimentos de SS-AD foram realizados em duplicata (acrescido do frasco controle) e monitorados durante 60 dias cada, totalizando 63 reatores, isto é, 21 reatores para cada relação A/M testada.

A Tabela 5.3 mostra o desempenho dos reatores nos ensaios em termos de remoção de matéria orgânica. A Figura 5.2S do Anexo (item 5.6) mostra as curvas de produção acumulada de metano para as três relações A/M durante os 60 dias de experimento. De maneira geral, a produção de metano obtida por SS-AD, a partir de excreta de aves e biomassa lignocelulósica, aumentou com a diminuição da relação A/M. Dentre as três relações testadas, exceto para a co-digestão com casca de amendoim, a relação A/M de 0,5 g SSV.gSSV⁻¹ apresentou produção de metano superior às outras. A co-digestão contendo sabugo de milho obteve a maior produção de metano (291,39 NL CH₄. gSV⁻¹ ou 126,02 Nm³. ton_{resíduo}⁻¹), seguida por palha de arroz (270,53 NL CH₄. gSV⁻¹ ou 113,40 Nm³. ton_{resíduo}⁻¹), serragem (262,57 NL CH₄. gSV⁻¹ ou 109,42 Nm³. ton_{resíduo}⁻¹), bagaço de cana-de-açúcar (229,70 NL CH₄. gSV⁻¹ ou 98,60 Nm³. ton_{resíduo}⁻¹), casca de café (155,30 NL CH₄. gSV⁻¹ ou 69,70 Nm³. ton_{resíduo}⁻¹) e casca de amendoim (137,20 NL CH₄. gSV⁻¹ ou 56,50 Nm³. ton_{resíduo}⁻¹). A digestão anaeróbia apenas de excreta de aves obteve um elevado valor para a produção de metano (301,95 NL CH₄. gSV⁻¹), quando o resultado é analisado na base de sólidos voláteis (SV). Entretanto, ao se analisar a produção por tonelada de resíduo (99,29 Nm³. ton_{resíduo}⁻¹), esse substrato ocupa a 4^a posição no ranking, uma vez que apresenta baixo teor de SV quando comparado aos outros substratos testados (Tabela 5.2). A produção total de metano aumentou cerca de 44 – 55% para as co-digestões contendo sabugo de milho, palha de arroz, serragem e esterco de aves, à medida que a relação A/M

diminuiu de 2 para 0,5 gSSV.gSSV⁻¹. Para as outras co-digestões, o aumento compreendeu dentre 1 – 13%.

Diversos trabalhos avaliaram o efeito da relação A/M para diferentes tipos de substrato no processo de digestão anaeróbia (DA). Para a digestão anaeróbia em fase líquida (LS-AD), as relações A/M adequadas variam de 0,5 a 2,3 (Souto et al., 2009; Turick et al., 1991; Chynoweth et al., 1993; Neves et al., 2006). Em um estudo conduzido por Hashimoto (1989) sobre a LS-AD mesofílica (35°C) de palha de trigo em batelada, uma redução significativa na produção total de metano foi observada em razões A/M acima de 4. Gunaseelan (1995) observou um aumento na produção de metano ao diminuir as relações A/M em LS-AD de *Parthenium hysterophorus L.*, uma erva daninha terrestre. Li et al. (2013b) também observaram diminuição da produção de metano ao aumentar a relação A/M de 0,5 a 3,0 na co-digestão mesofílica de excreta de aves e palha de milho.

Para a digestão anaeróbia em fase sólida (SS-AD), a definição da melhor faixa de relação A/M é controversa, variando muito de resíduo para resíduo. Liew et al. (2012) reportaram a razão A/M igual a 2 como sendo a melhor para a SS-AD de palha de milho, palha de trigo, resíduos de jardim e folhas, e notaram significativa diminuição da produção de metano ao aumentar a razão A/M para 4 e 5. Na co-digestão de resíduo alimentar e palha de arroz, Haider et al. (2015) reportaram que nas razões A/M de 1,5 e 2,0, houve acúmulo de AGVs devido à sobrecarga do substrato e à pouca quantidade de inóculo, destacando as razões A/M de 0,25 e 0,5 como mais adequadas para esse processo. Por outro lado, Liu et al. (2009) observaram que a relação A/M de 1,6 propiciou as melhores produções de metano na SS-AD termofílica (50°C) de resíduo alimentar, grama e na mistura de ambos os resíduos.

Tabela 5.3: Desempenho dos reatores anaeróbios ao final da co-digestão de biomassa lignocelulósica e excreta de aves.

Reator	Razão A/M	Rendimento CH ₄ (NL CH ₄ / kg SV)	Rendimento CH ₄ (NL CH ₄ / kg DQO)	pH inicial	pH final	AGVs (mg.L ⁻¹)	TAN (mg.L ⁻¹)	Remoção de DQO (%)	Remoção de Celulose (%)	Remoção de Hemicelulose (%)
PA:EA	0,5	270,53 ± 3,74	162,06 ± 2,43	9,03	7,68	573,85	344,05	80,92	86,51	16,59
	2	123,24 ± 0,10	76,98 ± 0,58	9,02	7,45	79,99	716,40	89,43	12,98	0,15
	4	144,49 ± 0,12	89,44 ± 0,08	9,03	7,35	652,37	1199,75	93,25	21,86	4,10
SM:EA	0,5	291,39 ± 0,56	219,99 ± 0,42	9,04	7,65	745,26	189,95	54,55	88,83	41,84
	2	131,58 ± 0,25	99,50 ± 0,27	9,02	7,43	132,95	492,15	63,91	27,30	14,94
	4	147,89 ± 0,69	112,20 ± 0,54	8,99	7,24	749,31	1253,65	88,89	25,30	10,25
CA:EA	0,5	137,22 ± 1,63	101,09 ± 1,14	9,03	7,76	971,31	1055,45	56,66	87,40	14,68
	2	84,13 ± 2,22	56,87 ± 0,51	9,04	7,41	131,36	360,90	75,94	53,13	25,32
	4	157,07 ± 0,65	104,20 ± 0,46	8,99	7,51	302,64	1127,45	73,15	56,33	13,17
SE:EA	0,5	262,57 ± 0,49	192,93 ± 0,24	9,03	7,64	828,44	279,75	49,89	90,54	33,71
	2	120,86 ± 0,02	67,42 ± 0,01	9,14	7,55	117,78	653,10	87,61	53,86	13,58
	4	98,91 ± 1,09	56,68 ± 0,64	9,03	7,45	880,70	1171,65	86,23	48,88	5,49
CC:EA	0,5	155,29 ± 0,20	115,76 ± 0,74	9,06	7,64	759,63	318,20	30,67	86,86	51,80
	2	153,84 ± 0,04	94,63 ± 0,18	9,07	7,55	283,20	759,70	81,03	65,36	42,18
	4	116,18 ± 3,56	75,98 ± 2,37	9,02	7,51	1391,16	1222,85	76,90	58,33	42,62
BC:EA	0,5	229,65 ± 7,04	165,24 ± 4,56	9,04	7,57	322,02	508,55	33,82	93,05	44,30
	2	199,71 ± 0,28	127,99 ± 0,37	9,03	7,53	92,69	294,05	91,46	80,23	34,86
	4	140,23 ± 1,10	81,00 ± 0,71	9,06	7,38	761,47	1245,95	91,70	76,59	40,87
EA	0,5	301,95 ± 6,35	196,24 ± 6,08	9,12	7,86	147,13	1749,95	32,20	nm	nm
	2	170,21 ± 0,53	157,49 ± 0,39	9,03	7,70	105,50	610,80	89,03	nm	nm
	4	123,02 ± 0,03	113,56 ± 0,03	9,09	7,40	1229,27	1533,00	84,56	nm	nm

TVFA: Ácidos graxos voláteis totais; TAN: Nitrogênio amoniacal total efluente

A Tabela 5.3 mostra o total de ácidos graxos voláteis (TVFA) produzidos em todos os ensaios experimentais. Exceto na co-digestão com casca de amendoim (CC-EA), os maiores teores de TVFAs foram produzidos na relação A/M igual a 4. Isso pode ser atribuído à maior quantidade de excreta contido nos substratos adicionados aos ensaios, uma vez que, segundo Zhou et al. (2011), a maior carga de microrganismos acidogênicos presentes no esterco produz, rapidamente, alta concentração de AGVs, que não podem ser consumidos pelos microrganismos metanogênicos na mesma velocidade, resultando no acúmulo de ácido e na queda do pH do reator. Todavia, o pH efluente nos reatores não alcançou níveis críticos e prejudiciais ao processo metanogênico, o que pode ser atribuído ao alto teor de nitrogênio, na forma de amônia, presente na excreta, que ao ser misturado com a solução do reator forma bicarbonato de amônio e ajuda a tamponar o pH (Murto et al., 2004; Lahav & Morgan, 2004). A concentração dos AGVs produzidos nos ensaios experimentais, para as diferentes razões A/M testadas, pode ser visualizado na Tabela 5.1S do Anexo (item 5.6). Na razão A/M igual a 4, observou-se acúmulo de ácido acético, como resultado da inibição termodinâmica causada pela sobrecarga orgânica aplicada no sistema. Por outro lado, na razão A/M igual a 0,5, diferentes proporções de ácido isobutírico e ácido acético foram observadas, padrão similar ao encontrado por Santos et al. (2018) na digestão anaeróbia de cascas de café.

Nitrogênio amoniacal (TAN) é gerado pela degradação biológica da matéria nitrogenada. Uma concentração ótima de amônia garante uma adequada capacidade tamponante do meio e permite a recuperação do sistema após sobrecarga de TVFAs, entretanto, pode levar à inibição da digestão anaeróbia se estiver em elevadas concentrações. Geralmente, concentrações inibitórias de TAN são reportadas na faixa de 3 – 6 g.L⁻¹ (Li et al., 2018). A Tabela 5.3 mostra que a concentração média de TAN, em todos os ensaios, diminui quando a relação A/M é reduzida de 4 para 0,5. Em todo o caso, a concentração de TAN não ultrapassa o valor de 2 g.L⁻¹, sugerindo que nenhum efeito inibitório de TAN foi observado nesses ensaios.

5.3.4. Modelagem da produção de metano e influência da biomassa lignocelulósica

A análise cinética e modelagem dos dados experimentais por SS-AD foi realizada para os quatro substratos (RS-PM, CC-PM, SW-PM e PM) que produziram a maior produção acumulada de metano por tonelada de resíduo. Dois modelos cinéticos, isto é, Gompertz modificado e Groot's, foram usados para ajustar os dados de produção acumuladas de metano, como visto na Figura 5.2, e os parâmetros cinéticos do modelo são mostrados na Tabela 5.4.

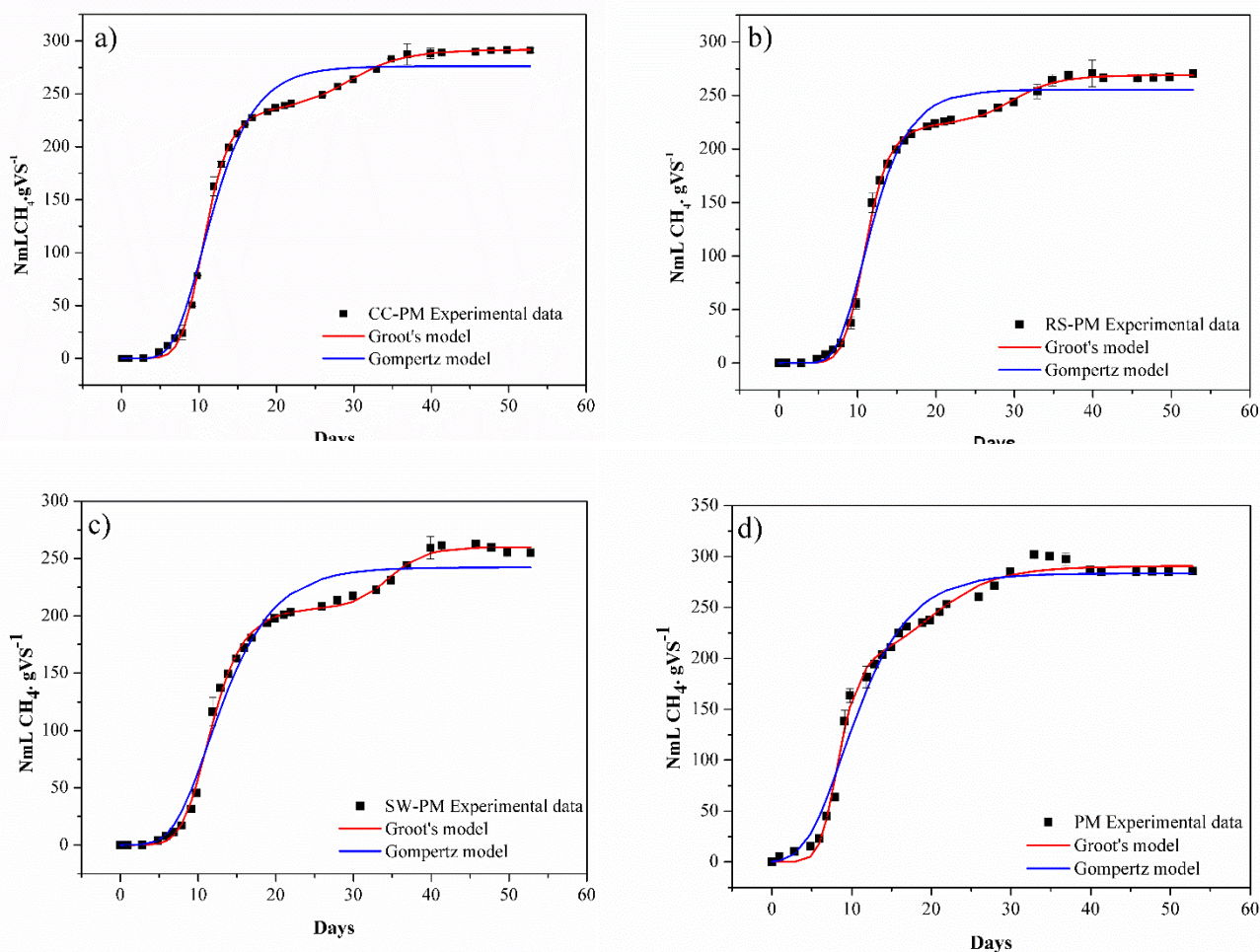


Figura 5.2: Produção acumulada de metano e ajuste dos modelos cinéticos para co-digestão SS-AD de excreta de aves com a) sabugo de milho (SM-EA), b) palha de arroz (PA-EA), c) serragem (SE-EA), bem como a monodigestão de excreta de aves (EA) na razão A/M de 0,5.

No caso do modelo de Groot's, para as condições PA-EA, SM-EA, SE-EA, os valores de produção de metano (A_1) no primeiro estágio foram baixos (44,5; 53,3; 51,6 NL CH_4 . kgSV^{-1}) quando comparado com o estágio 2 (A_2) (224,5; 238,6; 208,6 NL CH_4 . kgSV^{-1}). Duas hipóteses podem ser usadas para explicar o comportamento em múltiplos estágios durante a produção de biogás. A primeira delas está relacionada à rápida fermentação autônoma de cada substrato (fração solúvel rapidamente fermentável), seguida pela degradação estrutural dos carboidratos, devido às suas características químicas específicas (Tabela 5.1 e 5.2), de modo que a produção líquida de biogás é a soma do gás fermentado liberado a partir de cada componente (Cone et al., 1997). A segunda é relacionada a um processo sequencial na SS-AD, em que o primeiro estágio envolve a hidrólise extracelular de polissacarídeos lignocelulósicos (ex., amido, celulose) que podem produzir monossacarídeos como compostos intermediários, devido aos efeitos sinérgicos exercidos pela comunidade microbiana, como discutido na seção 'Caracterização da comunidade microbiana no esterco de aves'. Consequentemente, no segundo estágio, os monossacarídeos são fermentados pelo

consórcio anaeróbio produzindo ácidos graxos de cadeia curta, que levam à produção de mais biogás (López et al., 2010).

Por outro lado, para todas as condições analisadas, os valores do parâmetro C diminuem do primeiro para o segundo estágio. O parâmetro C para o modelo de Groot indica a nitidez da característica de comutação do perfil e seu aumento sugere que o perfil de produção de gás se torna mais sigmoidal, devido a uma taxa crescente de produção de biogás (Groot et al., 1996). Este comportamento é confirmado pela taxa máxima de produção de metano (μ_m) obtida pelo modelo de Gompertz para as misturas PA-EA, SM-EA, SE-EA e para EA (Tabela 5.4).

A análise dos tempos de fase lag (~ 7 dias) obtidos pelo modelo de Gompertz modificado, mostra pouca diferença entre os substratos SM-EA, PA-EA e SE-EA. Enquanto isso, a mono-digestão de excreta de aves forneceu cerca de 4 dias de fase lag, e essa redução do tempo de fase lag pode ser primeiramente atribuída à adaptação prévia do inóculo à presença de biomassa lignocelulósica. Li et al. (2013) reportaram redução do tempo de fase lag de 2,8 para 0,3 dias, ao substituir o inóculo proveniente de estação de tratamento de esgotos por um inóculo de estação de tratamento de esterco avícola, na digestão de excreta de aves, respectivamente. Para a digestão de palha de milho, os autores reportaram uma redução menos acentuada na fase lag, de 1,9 para 1,3 dias.

O modelo cinético de múltiplos estágios de Groot foi o que melhor descreveu a produção de metano com base nos valores das funções de erro (R^2 , RMSE, NRMSE e AIC) (Tabela 5.4). Uma explicação para esse comportamento de “estágio múltiplo” na produção de metano é a adaptação dos microrganismos à presença de compostos inibidores como a lignina da biomassa lignocelulósica (Li et al., 2018).

As maiores e menores produções de metano observadas com SM-EA (126,0 Nm³. Ton resíduo⁻¹) e CA-EA (56,5 Nm³.ton resíduo⁻¹), respectivamente, podem ser atribuídas ao efeito antagonístico causado pelos teores de hemicelulose (31,6% vs. 12,6%) e de lignina (18,7% vs. 50,7%) nessas biomassas lignocelulósicas (Tabela 5.1). Embora haja uma correlação clara de tais parâmetros para SM e CA, este não foi o caso para as outras biomassas estudadas.

A indicação de que existiria uma importante correlação entre os açúcares C5, constituintes das hemiceluloses, e a biometanização de resíduos agroindustriais, já foi anteriormente sugerida por Baêta et al. (2017) e Lima et al. (2018), que avaliaram a digestão anaeróbia de cascas de café e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. Da mesma forma, a correlação linear negativa existente entre a produção de metano e o teor de lignina foi reportada por Tong et al. (1990) e Liew et al. (2012). Tong et al. (1990) mostraram uma correlação linear pobre ($R^2 = 0,59 - 0,69$) entre a produção de metano e o teor de lignina de sete tipos de biomassas lignocelulósicas, incluindo palha de milho, dois lotes de palha de trigo, grama napier, aparas de madeira, jornal e abeto branco, em digestão anaeróbia contendo baixo teor de sólidos (TS < 1%). Liew et al. (2012), por sua vez, mostraram alta correlação

linear ($R^2 = 0,9469$) entre o teor de lignina e a produção de metano por quatro tipos de biomassas, como palha de milho, palha de trigo, folhas e resíduos de jardim, em SS-AD com alto teor de sólidos (TS = 22%).

Tabela 5.4: Parâmetros cinéticos dos modelos de Gompertz e Groot para a produção de metano em SS-AD nas melhores condições.

Modelos	Parâmetros	Co-digestão anaeróbia em fase sólida			
		PA-EA	SM-EA	SE-EA	EA
Groot's	A ₁	44.58	53.29	51.57	82.40
	B ₁	29.99	30.01	34.73	21.33
	C ₁	11.07	9.20	15.61	6.07
	A ₂	224.54	238.64	208.56	208.67
	B ₂	11.10	10.82	11.79	8.45
	C ₂	7.63	6.80	5.83	6.63
	R ²	0.999	0.999	0.998	0.994
	RMSE	3.47	3.09	4.04	7.75
	NRMSE	1.28	1.07	1.56	2.70
	AIC	89.26	81.85	98.67	139.03
Gompertz	P ₀	255.25	276.18	242.26	283.43
	μ _m	29.01	27.41	19.33	22.36
	λ	7.39	6.69	6.72	4.14
	R ²	0.986	0.985	0.980	0.981
	RMSE	12.24	13.32	13.64	14.20
	NRMSE	4.52	4.57	5.34	4.97
	AIC	161.31	166.56	168.02	170.53

PA – palha de arroz; SM – sabugo de milho; SE – serragem; EA – esterco de aves.

Na Tabela 5.3, observa-se ainda que, exceto para a co-digestão CA-EA, a razão A/M de 0,5 resultou na maior remoção de celulose e hemicelulose da matriz lignocelulósica (material da cama) acrescentada aos substratos. Diante desse resultado, a relação A/M 0,5 propiciou maior acessibilidade às biomassas por parte dos microrganismos do inóculo, uma vez que a baixa quantidade de alimento disponível fez com que os microrganismos degradassem a matriz lignocelulósica de forma mais efetiva. Efeito contrário é visto nas condições de maior disponibilidade de alimento (A/M 4 e 2), em que celulose e hemicelulose não são degradadas de forma efetiva.

O sabugo de milho (SM) e a palha de arroz (PA) podem ter se destacado como co-substratos potenciais em SS-AD devido ao seu teor de amido, que varia de 53,6 - 55,9% (Szyszkowska et al., 2007) e 2,3 - 21,6% (Teramura et al., 2013), respectivamente. Teramura et al. (2013) observaram que o teor de amido no PA, por exemplo, está positivamente correlacionado com a glicose liberada para processos fermentativos, e que a glicose é então preferencialmente liberada do amido do que da fração celulósica nesta biomassa.

Além de apresentar alto teor de amido, o SM possui baixo teor de lignina (18,7%) e alto teor de hemicelulose (31,6%). A hemicelulose é a principal fonte de açúcares C5 utilizados em processos fermentativos, o que possivelmente permite maior acessibilidade das enzimas α -amilase e 1,4- β -xilosidase (seção 3.2) na degradação das frações de amido e hemicelulose, respectivamente. Por outro lado, SW, SB, CH e PS têm um teor de lignina ligeiramente maior do que SM e PA e muito pouco teor de amido disponível para o ataque enzimático da α -amilase. Essa condição os torna dependentes da ação das β -xilosidasas para degradação da fração hemicelulósica, que depende de sua acessibilidade. A lignina é o principal contribuinte para a recalcitrância da biomassa e um dos principais constituintes que afetam a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica (Himmel et al., 2007). Devido ao seu revestimento protetor e natureza hidrofóbica, a lignina retarda a acessibilidade da celulose a enzimas e ataques microbianos, levando à baixa degradação das holoceluloses (Chang & Holtzaple, 2000).

5.3.5. *Balanco energético*

Os resultados do balanço de energia para as condições experimentais (PA-EA, SM-EA, SE-EA e EA) com maior rendimento de metano estão resumidos na Figura 5.3. Como pode ser visto na Figura 5.3, a energia excedente foi obtida para todas as condições experimentais SS-AD considerando como gasto apenas a energia utilizada na purificação do biogás. Os melhores resultados de energia disponível, expressos em MJ por kg de frango vivo, foram obtidos quando a co-digestão anaeróbia de SM-EA ($2,39 \text{ MJ} \cdot \text{Kg de frango vivo}^{-1}$) é usada, confirmando o efeito sinérgico dos teores de lignina, hemicelulose e amido na conversão do biogás. De acordo com os resultados do processo SS-AD para SM-EA é possível obter $0,24 \text{ kWh} \cdot \text{kg de frango vivo}^{-1}$ de energia elétrica e $1,73 \text{ MJ} \cdot \text{kg de frango vivo}^{-1}$ de energia térmica. Esse excedente de energia elétrica ($0,32 \text{ kWh} \cdot \text{Kg resíduo}^{-1}$) está de acordo com o obtido por Valenti et al. (2018) ($0,37 \text{ kWh} \cdot \text{Kg resíduo}^{-1}$), que usou uma mistura de esterco de gado, excreta de aves, silagem de milho, polpa cítrica e bagaço de azeitona em um processo de co-digestão anaeróbia e confirmou que as características físico-químicas das misturas (teores de carbono e nitrogênio, bem como a presença de material fibroso) influenciou na produção de energia. Por outro lado, a energia térmica produzida no processo SS-AD do SM-EA ($1,73 \text{ MJ} \cdot \text{Kg de frango vivo}^{-1}$) seria capaz de repor metade ($\sim 53,2\%$) da energia gasta como lenha em uma granja típica, que corresponde a $3,25 \text{ MJ} \cdot \text{kg frango vivo}^{-1}$, conforme relatado por Marchioro et al. (2018).

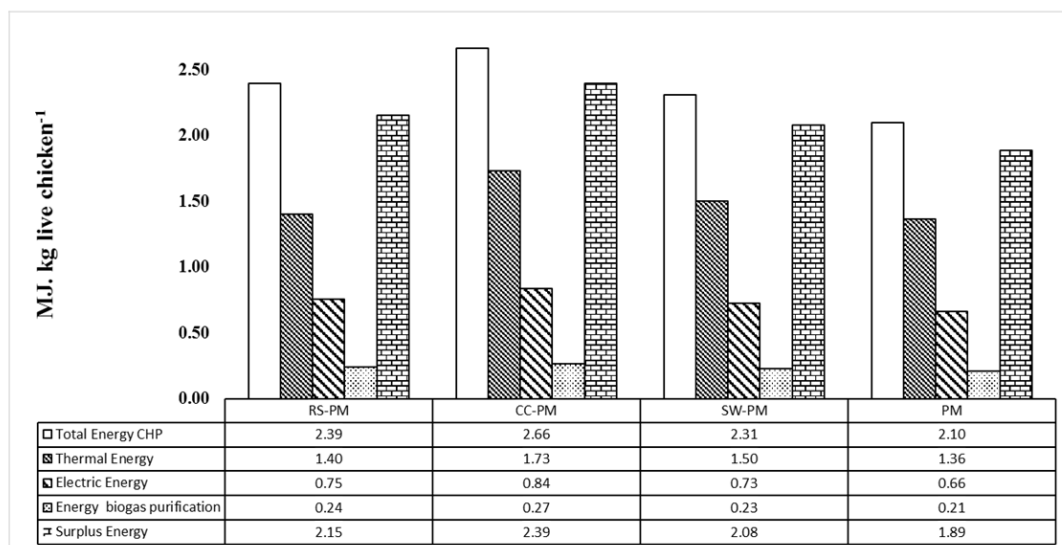


Figura 5.3: Balanço energético utilizando sistema CHP para co-digestão SS-AD de excreta de aves com palha de arroz (PA-EA), sabugo de milho (SM-EA) serragem (SE-EA) e mono-digestão de excreta de aves (EA).

Posteriormente, os valores de emissão de CO₂ equivalente foram calculados de acordo com a metodologia desenvolvida pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (<https://www.epa.gov/energy/greenhouse-gas-equivalencies-calculator>) resultando em 0,638 e 0,339 kg CO₂-eq. kg de frango vivo⁻¹ para lenha e energia térmica (a partir do biogás), respectivamente. Isso mostra que é possível reduzir as emissões de GEE em 46,9% com o uso do biogás obtido pelo SS-AD, diminuindo os impactos energéticos e ambientais durante o processo de produção de aves.

Por outro lado, o principal consumo de energia na avicultura está relacionado aos sistemas de aquecimento, ventilação, distribuição de ração e ar condicionado. A quantificação de seu consumo de energia é bastante complexa porque esses sistemas não são homogêneos e variam com as tecnologias aplicadas, as características de produção das fazendas e as condições climáticas (Mattioli et al., 2018). Consequentemente, autores como Arroyo-Pitacua et al. (2015) e Mattioli et al. (2018) estimaram que 9,3 e 37,5 MJ, respectivamente, são necessários para produzir 1 kg de frango vivo. Segundo esses autores, o sistema experimental desenvolvido neste estudo (processo SS-AD com SM-EA) seria capaz de fornecer entre 7,1 a 25,2% da energia total utilizada na produção de frangos de corte em países como Brasil ou México.

5.4. Conclusão

A produção de metano a partir da co-digestão anaeróbia em estado sólido (SS-AD) de biomassa lignocelulósica e excreta de aves adotando uma relação alimento/microrganismo (A/M) de 0,5 foi significativamente melhor do que as outras A/M testadas (2 e 4), devido à maior acessibilidade à biomassa pelos microrganismos do inóculo. O modelo de múltiplos estágios do Groot se ajustou melhor aos dados de produção de metano e sugere que a produção em estágios pode estar relacionada à aclimação microbiana à lignina. O uso de dejetos de aves no SS-AD foi capaz de suprir metade da demanda térmica gasta com lenha em uma granja típica.

5.5. Referências

- Arroyo-Pitacua, A., Márquez-Benavides, L., Moreno-Goytia, E.L., 2015. Energy requirements in a technified poultry farm in Central Mexico. *WIT Trans. Ecol. Environ.* 195, 233–241.
- Apha, A., 2005. *WWE, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, twenty first ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Baêta, B. E. L., Cordeiro, P. H. de M., Passos, F., Gurgel, L. V. A., de Aquino, S. F., & Fdz-Polanco, F., 2017. Steam explosion pretreatment improved the biomethanization of coffee husks. *Bioresour Technol* 245, 66–72.
- Bassani I., Kougiás P.G., Treu L., Angelidaki I., 2015. Biogas Upgrading via Hydrogenotrophic Methanogenesis in Two-Stage Continuous Stirred Tank Reactors at Mesophilic and Thermophilic Conditions. *Environ Sci Technol* 49, 12585-12593.
- Cano, R., Pérez-Elvira, S.I., Fdz.-Polanco, F., 2015. Energy feasibility study of sludge pretreatments: A review. *Appl. Energy* 149, 176–185.
- Cardinali Rezende, J.; Araújo, J.C.; Almeida, P.G.S.; Chernicharo, C.A.L.; Sanz, J.L.; Chartone Souza, E.; Nascimento, A.M.A., 2013. Organic loading rate and food to microorganism ratio shape prokaryotic diversity in a demo scale up flow anaerobic sludge blanket reactor treating domestic wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 993-1003.
- Chang V.S., Holtzapple M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol* 84-6, 5-37.
- Chynoweth D.P., Turick C.E., Owens J.M., Jerger D.E., Peck M.W., 1993. Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass Bioenerg* 5, 95-111.
- Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Driehuis, F., 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. *Anim. Feed Sci. Technol.* 66, 31–45.
- Costa, J. C., Barbosa, S. G., Alves, M. M. and Sousa, D. Z., 2012. Thermochemical Pre- and Biological Co-Treatments to Improve Hydrolysis and Methane Production from Poultry Litter. *Bioresour Technol* 111, 141–147.
- Dahunsi, S. O., Oranusi, S., & Efevbokhan, V. E., 2017. Optimization of pretreatment, process performance, mass and energy balance in the anaerobic digestion of *Arachis hypogaea* (Peanut) hull. *Energy Convers. Manag* 139, 260 – 275.

- Dhamodharan, K., Kumar, V. & Kalamdhad, A. S., 2015. Effect of different livestock dungs as inoculum on food waste anaerobic digestion and its kinetics. *Bioresour Technol* 180, 237–241.
- EMBRAPA. Brazilian Agricultural Research Corporation. <http://www.embrapa.br>. (Accessed in April 24, 2019).
- Fouhy, F., Clooney, A. G., Stanton, C., Claesson, M. J., & Cotter, P. D., 2016. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiology*, 16.
- Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A., Lantinga, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77–89.
- Gunaseelan V.N., 1995. Effect of inoculum substrate ratio and pretreatments on methane yield from *Parthenium*. *Biomass Bioenerg* 8, 39-44.
- Guo, J., Peng, Y., Ni, B.J., Han, X., Fan, L., Yuan, Z., 2015. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb. Cell Fact.* 14, 1–11.
- Haider, M. R., Zeshan, Yousaf, S., Malik, R. N., & Visvanathan, C., 2015. Effect of mixing ratio of food waste and rice husk co-digestion and substrate to inoculum ratio on biogas production. *Bioresour Technol* 190, 451–457.
- Hashimoto A.G., 1989. Effect of inoculum substrate ratio on methane yield and production-rate from straw. *Biol Wastes* 28, 247-255.
- Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., Foust T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315, 804-807.
- Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S., 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Microbial Ecol.* 70, 1641–1650.
- Lahav, O., Morgan, B.E., 2004. Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries - a review. *J. Chem. Technol. Biot.* 79, 1331-1341.
- Li, Y.Q., Zhang, R.H., Chang, C., Liu, G.Q., He, Y.F., Liu, X.Y., 2013b. Biogas production from co-digestion of corn stover and chicken manure under anaerobic wet, hemi-solid, and solid state conditions. *Bioresour Technol* 149, 406-412.
- Li, W., Khalid, H., Zhu, Z., Zhang, R., Liu, G., Chen, C., Thorin, E., 2018. Methane production through anaerobic digestion: Participation and digestion characteristics of cellulose, hemicellulose and lignin. *Appl. Energy* 226, 1219–1228.
- Liu, G., Zhang, R., El-Mashad, H. M. & Dong, R., 2009. Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes. *Bioresour Technol* 100, 5103–5108.
- Liew, L. N., Shi, J., & Li, Y., 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass Bioenerg* 46, 125–132.
- Lima, D. R. S.; Adarme, O. F. H.; Baêta, B. E. L.; Gurgel, L. V. A.; Aquino, S. F., 2018. Influence of different thermal pretreatments and inoculum selection on the biomethanation of sugarcane bagasse by solid-state anaerobic digestion: a kinetic analysis. *Ind. Crop. Prod.* 111, 684-693.

- López, S., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., Bannink, A., Kebreab, E., France, J., 2010. Modelling nutrient digestion and utilisation in farm animals, 1st Editio. ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Mainardis, M., Flaibani, S., Mazzolini, F., Peressotti, A., Goi, D., 2019. Techno-economic analysis of anaerobic digestion implementation in small Italian breweries and evaluation of biochar and granular activated carbon addition effect on methane yield. *J. Environ. Chem. Eng.* 7, 103184.
- Marchioro, V., Steinmetz, R.L.R., do Amaral, A.C., Gaspareto, T.C., Treichel, H., Kunz, A., 2018. Poultry Litter Solid State Anaerobic Digestion: Effect of Digestate Recirculation Intervals and Substrate/Inoculum Ratios on Process Efficiency. *Front. Sustain. Food Syst.* 2, 1–10.
- Mattioli, M.C., Campos, A.T., Yanagi Junior, T., Marin, D.B., Eugênio, T.M.C., Costa Junior, J.E.V., 2018. Energy analysis of broiler chicken production system with darkhouse installation. *Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient.* 22, 648–652.
- McBride M.J., 2014. The Family Flavobacteriaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Murto, M., Bjornsson, L., Mattiasson, B., 2004. Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *J. Environ. Manage.* 70, 101–107.
- Neshat, S. A., Mohammadi, M., Najafpour, G. D., & Lahijani, P., 2017. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 79, 308 – 322.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agroindustrial residues: I: sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 74, 69–80.
- Rahman, M.D.A., Moller, H. B., Saha, C. K., Alam, Md. M., Wahid, R., Feng, L., 2017. Optimal ratio for anaerobic co-digestion of poultry droppings and lignocellulosic-rich substrates for enhanced biogas production. *Energy Sustain Dev.* 39, 59 – 66.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A., 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.* 3, 700–714.
- Santos, L. C., Adarme, O. F. H., Baêta, B. E. L., Gurgel, L. V. A. & Aquino, S. F., 2018. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. *Bioresour Technol* 263, 601–612.
- Souto, T. F.; Aquino, S. F.; Silva, S. Q.; Chernicharo, C. A. L., 2009. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation (Dordrecht)* 21, 411-424.
- Szczodrak, J., Llczuk, Z., Rogalski, J., & Leonowicz, A., 1985. Intensification of Oak Sawdust Enzymatic Hydrolysis by Chemical or Hydrothermal Pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 504 – 510.
- Szyszkowska, A., Sowiński, J., Wierzbicki, H., 2007. Changes in the chemical composition of maize cobs depending on the cultivar, effective temperature sum and farm type. *Acta Sci. Pol.*, 6(1), 13-22.
- Teramura, H., Oshima, T., Matsuda, F., Sasaki, K., Ogino, C., Yamasaki, M., & Kondo, A., 2013. Glucose content in the liquid hydrolysate after dilute acid pretreatment is affected by the starch content in rice straw. *Bioresource Technology*, 149, 520–524.

- Tong X.G., Smith L.H., Mccarty P.L., 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass* 21, 239-255.
- Tong Z., Yuheng Y., Linlin L., Youyang H., Guangxin R., Gaihe Y., 2014. Improved biogas production from chicken manure anaerobic digestion using cereal residues as co-substrates. *Energy Fuel* 28, 2490–2495.
- Valenti, F., Zhong, Y., Sun, M., Porto, S.M.C., Toscano, A., Dale, B.E., Sibilla, F., Liao, W., 2018. Anaerobic co-digestion of multiple agricultural residues to enhance biogas production in southern Italy. *Waste Manag.* 78, 151–157.
- Wirth, R., Kovács, E., Mároti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, L., 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol Biofuels* 5:41.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Riet, K.V., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.
- Zhou, Y., Zhang, Z., Nakamoto, T., Li, Y., Yang, Y., Utsumi, M., Sugiura, N., 2011. Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. *Biomass Bioenerg* 35, 3251–3256.
- Zhang, T., Liu, L., Song, Z., Ren, G., Feng, Y., Han, X., & Yang, G., 2013. Biogas Production by Co-Digestion of Goat Manure with Three Crop Residues. *PLoS ONE*, 8, e66845.

5.6. Anexos

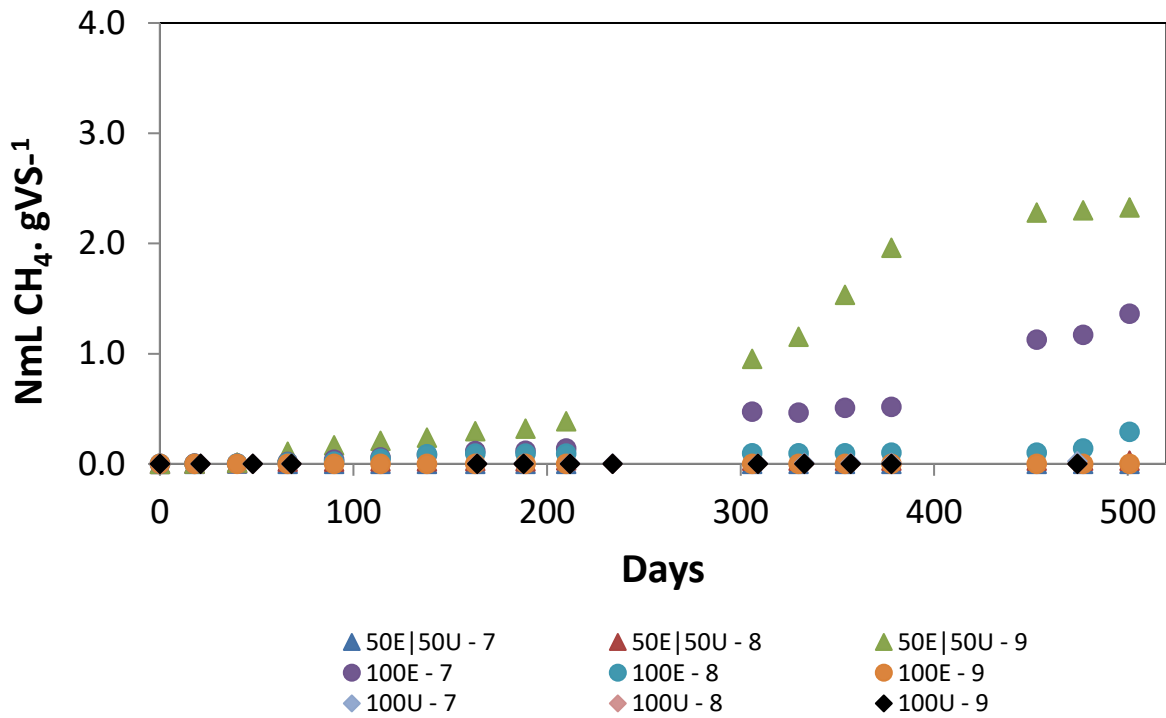


Figura 5.1S: Produção endógena de metano pelo inóculo: 50% (em SV) esterco de aves + 50% (em SV) lodo UASB (50E|50U), 100% esterco de aves (100E) and 100% lodo UASB (100U), no pH 7, 8 e 9.

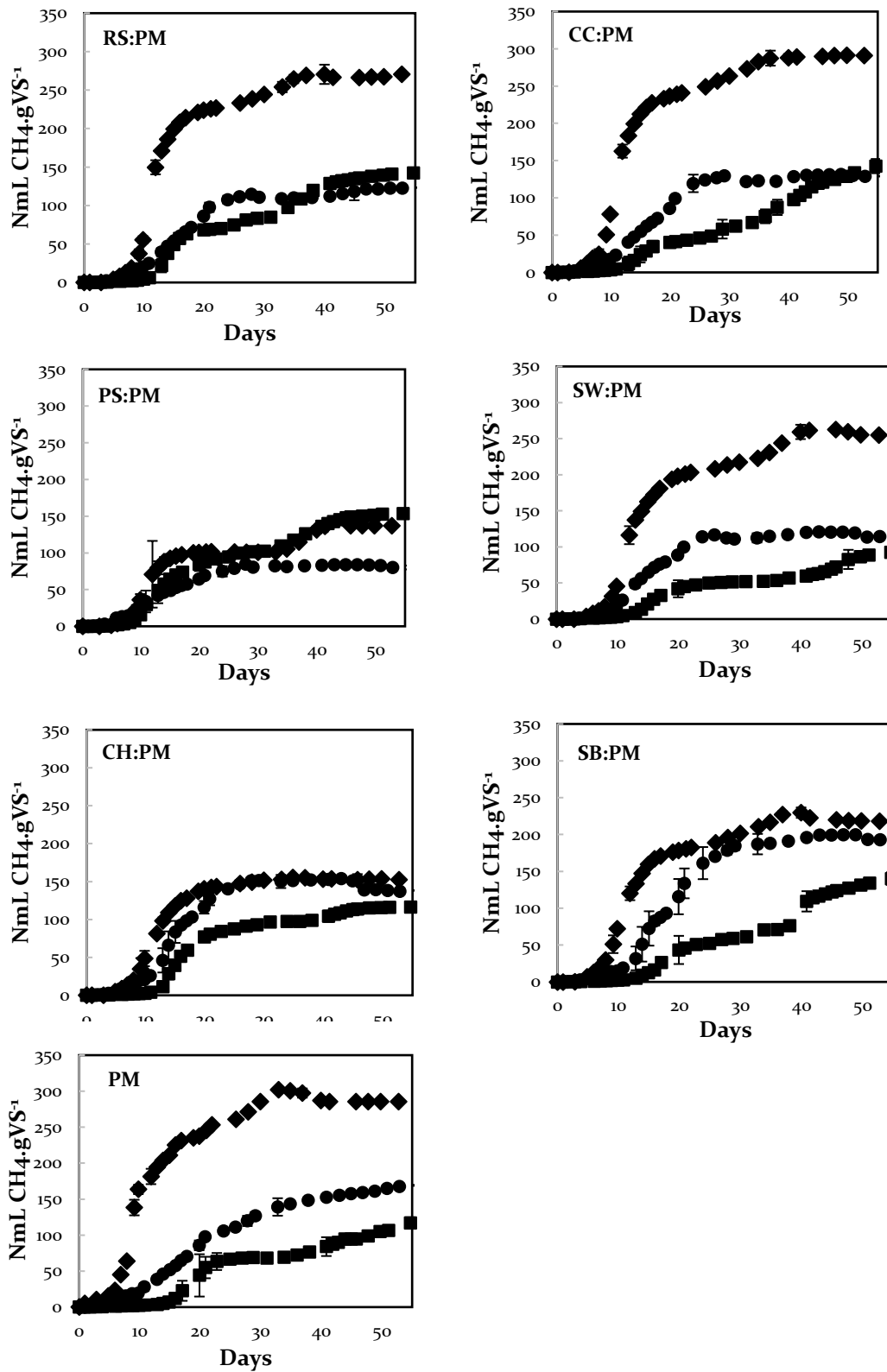


Figura 5.2S: Produção acumulada de metano obtida com a co-digestão anaeróbia de diferentes substratos nas três razões A/M.

Tabela 5.1S: Acúmulo de AGVs observados no final dos testes SS-AD.

Co-digestão	Razão A/M	HForm	HAc	HBu (Iso)	HBu
PA:EA	4	n.d.	625.28	27.09	n.d.
	2	n.d.	46.57	33.42	n.d.
	0.5	n.d.	107.84	466.00	n.d.
SM:EA	4	n.d.	749.31	n.d.	n.d.
	2	n.d.	93.48	39.47	n.d.
	0.5	n.d.	104.76	640.50	n.d.
CA:EA	4	64.78	204.91	32.94	n.d.
	2	n.d.	85.36	46.00	n.d.
	0.5	n.d.	402.55	568.77	n.d.
SE:EA	4	n.d.	839.57	41.13	n.d.
	2	n.d.	70.55	47.23	n.d.
	0.5	n.d.	331.85	496.59	n.d.
CC:EA	4	n.d.	1161.24	39.12	190.80
	2	n.d.	88.54	34.60	160.06
	0.5	n.d.	333.75	425.89	n.d.
BC:EA	4	28.49	691.30	41.67	n.d.
	2	n.d.	46.61	46.08	n.d.
	0.5	n.d.	93.82	228.20	n.d.
EA	4	n.d.	1191.76	37.51	n.d.
	2	n.d.	62.66	42.84	n.d.
	0.5	n.d.	96.82	50.31	n.d.

HForm – Ácido fórmico; HAc – Ácido acético; HBu (Iso) – Ácido Isobutírico; HBu – Ácido Butírico; n.d. – não detectado.

OBS: Ácido propiônico não foi detectado em nenhum ensaio.

6. ANÁLISE DE TILOSINA EM CAMA DE AVIÁRIO POR HPLC-UV E HPLC-MS/MS APÓS LTPE²

Resumo: A crescente demanda por carne de frango no Brasil estimula os produtores de frango a investir em antibióticos para garantir a qualidade de seus produtos. Entre estes, o antibiótico tilosina é extensamente utilizado como promotor de crescimento e auxilia no tratamento de enterite necrótica. Os antibióticos geralmente não são totalmente metabolizados e podem ser excretados em sua forma original, contaminando diferentes compartimentos ambientais e podem induzir resistência microbiana. Portanto, análises de tais contaminantes em diferentes matrizes são importantes para a realização de avaliações de risco e isso, muitas vezes, depende do desenvolvimento de métodos de extração para permitir a quantificação da substância em baixas concentrações. Este trabalho apresenta uma metodologia simples e barata que emprega extração por partição a baixa temperatura (LTPE) para a análise de tilosina em amostras de cama de aviário por HPLC-UV e HPLC-MS/MS. O método analítico desenvolvido foi validado segundo agências reguladoras brasileiras (ANVISA e MAPA) e resultou em limites de detecção (LDM) e quantificação (LQM) do método de 6,32 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 21,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. A análise do resíduo proveniente de empresa produtora de frangos de corte, situada em Minas Gerais, confirmou a adequação do método, que detectou tilosina em concentrações médias de 135,22 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 264,92 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em cama de aviário de galpões contendo aves na fase de recria e de produção, respectivamente.

Palavras-chave: Tilosina, cama de aviário, método analítico, HPLC, LTPE.

6.1. Introdução

Nos últimos anos, o Brasil vem se destacando na produção e exportação de carne. Em 2017, o país alcançou a primeira posição no ranking das exportações de carne de frango e a quarta posição na exportação de carne suína, além de ter sido o segundo maior produtor de carne bovina no mesmo ano (EMBRAPA, 2019). Nesse cenário, destaca-se a produção de carne de frango, com cerca de 6,2 bilhões de cabeças produzidas em 2017 (AVIMIG, 2019). Isso se deve, principalmente, em função da mudança de hábito de consumo de carne no Brasil, que deixou de ser um país essencialmente consumidor de carne bovina e passou a ser consumidor de carne de frango, apresentando um consumo equivalente a 41,10 $\text{kg.hab}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, no ano de 2016 (ABPA, 2018).

² O conteúdo deste capítulo foi publicado como: 'PARANHOS, A.G.O. PEREIRA, A.R., FONSECA, I.C., SANSON, A.L., AFONSO, R.J.C.F., AQUINO, S.F. International Journal of Environmental Analytical Chemistry (2020). DOI: 10.1080/03067319.2019.1694921

De forma a atender a expectativa do mercado brasileiro concomitante aos incentivos governamentais, os produtores de aves investem em medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia, como antibióticos e antimicrobianos, a fim de assegurar a qualidade e competitividade de seus produtos. Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autoriza o uso de 14 compostos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais de uso comum para diversas espécies animais, como bovinos, suínos e aves (Palermo-Neto et al., 2006).

A tilosina, até o ano de 2018, era um dos antibióticos mais amplamente consumidos como promotores de crescimento na fase final de desenvolvimento dos frangos. A substância auxilia no tratamento de enterite necrótica, causada por *Clostridium perfringens*, e no tratamento e prevenção de doenças respiratórias crônicas, causadas por *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, em frangos e perus de corte (Costa et al., 2013). Entretanto, desde que a tilosina foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) como “antimicrobiano criticamente importante de prioridade máxima”, devido à sua semelhança estrutural com o antibiótico de uso humano eritromicina (Figura 6.1) e a verificação de resistência cruzada entre as duas substâncias, esta entrou na lista dos antimicrobianos indicados para proibição segundo a Portaria SDA/MAPA nº 171, de 13 de dezembro de 2018 (BRASIL, 2018). Tal portaria proíbe, nacionalmente, o uso da tilosina, e de outros antimicrobianos, como aditivos promotores de crescimento em animais. Por outro lado, a tilosina continua com seu uso permitido para fins terapêuticos. (BRASIL, 2018).

Uma vez inseridos no organismo animal via alimentação, muitos desses antibióticos não são totalmente metabolizados, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou parcialmente metabolizado (Sarmah, Meyer, e Boxall, 2006). Assim, a utilização da cama de aviário – principal resíduo gerado na avicultura – como fertilizante em solos agrícolas ou a disposição do resíduo no ambiente pode acarretar a dispersão de compostos no meio ambiente. Após a aplicação do resíduo no solo, os antibióticos de uso avícola podem ser transportados por escoamento superficial, constituindo-se a principal via de entrada dessas substâncias no ambiente aquático (Kemper, 2008). Diversos estudos recentes sobre o tema, tem detectado a presença de antibióticos, em concentrações da ordem de ng.L^{-1} a mg.L^{-1} , em diferentes amostras ambientais, tais como água, solo, sedimentos e dejetos animais (Leal et al. 2012; Martínez-Carballo et al. 2007; Ok et al. 2011; Pinheiro et al. 2013; Zhao, Dong, e Wang, 2010).

Em relação à saúde humana, o maior problema relacionado à ocorrência desses compostos no ambiente é o aumento de cepas resistentes aos antibióticos e a possibilidade de contaminação cruzada (Kemper, 2008). Esse tipo de preocupação emergente se encaixa dentro do conceito de Saúde Única (do inglês: *One Health*) (OMS, 2017), que trata da integração entre saúde humana, saúde animal, ambiente e adoção de políticas públicas efetivas na prevenção e controle de enfermidades. Tal motivo

tem motivado o desenvolvimento de diversas pesquisas envolvendo a identificação e quantificação de antimicrobianos em alimentos, como carne (Horie et al. 1998), mel (Thompson et al. 2003) e ovos (Spisso et al. 2010) e matrizes ambientais, como lodos ativados (Prado, Ochoa e Amrane, 2009) e resíduos animais (Angenent et al. 2008; Loke et al. 2000; Stone, Clay e Spellman, 2010; Teeter e Meyerhoff, 2003).

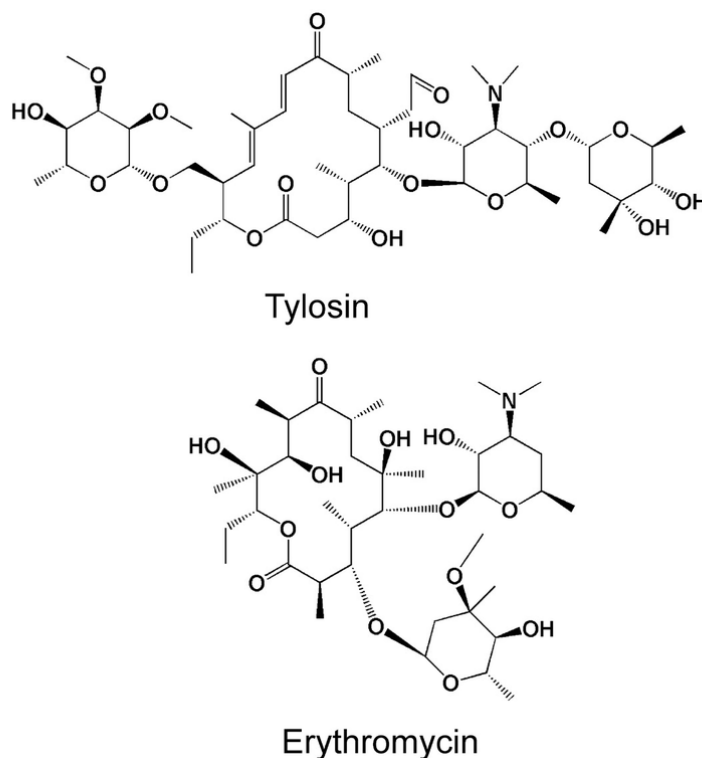


Figura 6.1: Estrutura química genérica da Tilosina e Eritromicina.

Das metodologias de extração geralmente utilizadas para a análise de contaminantes ambientais, a grande maioria envolve o uso de cartuchos para extração em fase sólida (SPE, do inglês: *Solid Phase Extraction*) (Sismotto, Augusto & Paschoal, 2013). O custo relativamente elevado dos cartuchos contribuiu para reduzir a aplicação rotineira dessa metodologia. Por outro lado, a técnica Extração Particionada a Baixa Temperatura (LTPE, do inglês: *Low Temperature Partitioning Extraction*) tem se mostrado uma técnica simples e fácil para recuperação de antibióticos de matrizes complexas, além de apresentar menor custo quando comparada à clássica técnica SPE (Barros et al., 2018; Maia et al., 2017; Rodrigues et al., 2018). A técnica de Extração Particionada a Baixa Temperatura é uma técnica ambientalmente amigável. O procedimento consiste em adicionar uma pequena quantidade de solvente orgânico miscível (tipicamente acetonitrila) à amostra e congelar a mistura resultante à -20°C por pelo menos 3h, no qual a fase aquosa se solidificará e a fase orgânica que contém o analito de interesse permanecerá líquida (Magalhães et al., 2012). Acetato de etila,

acetona e metanol são alguns dos outros solventes que podem ser empregados nessa técnica. O uso de acetonitrila como solvente extrator na LTPE possui a vantagem de extrair menos interferentes lipofílicos das matrizes quando comparado à acetona ou acetato de etila. Além disso, o uso de acetonitrila na LTPE permite a extração de compostos polares do meio aquoso, com boas eficiências de recuperação (Maštovská et al., 2004; Gomes et al., 2017).

Em relação à quantificação, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*) com detecção por UV-Vis é uma técnica precisa quando aplicada na análise de altas concentrações do analito. Entretanto, em baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas tem se mostrado uma técnica mais seletiva, precisa e confiável para diferentes contaminantes ambientais (Barros et al., 2018).

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia de extração por LTPE do antibiótico veterinário tilosina, o qual será posteriormente quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV-Vis (HPLC-UV) para elevadas concentrações, e à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) para baixas concentrações.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Reagentes e Materiais

Tartarato de tilosina (padrão analítico), forma solúvel do composto ativo tilosina, foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila grau HPLC foi obtida da J.T.Backer (Phillipsburg, NJ, USA). Água ultrapura ($18,18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) foi obtida em um ultrapurificador de água Master All Gehaka.

6.2.2. Métodos

Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas para amostras com concentrações na faixa de $0,5$ a 100 mg.L^{-1} (4 a 800 mg kg^{-1}) foram realizadas em sistema HPLC-UV Shimadzu (Kyoto, Japan), composto de bombas (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A3), controlador (CBM-20A), injetor automático (SIL-20AC), detector UV-Vis (SPD-20A) e forno de coluna (CTO-20A). Os dados foram adquiridos pelo software LabSolutions Version 1.25 by Shimadzu.

Baixas concentrações de tilosina na faixa de 5 a $500 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (40 a $4000 \text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$), foram quantificadas pelo equipamento LCMS-8040 triplo quadrupolo (Shimadzu – Kyoto, Japan) com fonte de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), acoplado ao sistema HPLC composto por bombas (LC-30AD), controlador (CBM-20A), degaseificador (DGU-20AR5), forno de coluna

(CTO-30A) e injetor automático (SIL-30AC). A aquisição de dados foi realizada pelo software LabSolutions Version 5.53 SP3 (Shimadzu).

Preparação das soluções estoque e soluções de trabalho

Para o preparo das soluções estoque, 0,025g e 2,5 g de tartarato de tilosina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) foram adequadamente pesados e dissolvidos em 25 mL de acetonitrila (J.T.Backer - Phillipsburg, NJ, USA), de forma a obter as concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, respectivamente. Para a construção da curva de calibração externa, alíquotas das duas soluções estoque (5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µL) foram transferidas quantitativamente para vials de 1.5 mL e o volume completado para 1.0 mL com acetonitrila.

6.2.3. Extração das amostras

O procedimento de extração das amostras foi realizado conforme o esquema apresentado na Figura 6.2. Amostras de 1,0 g de esterco de aves controle – ausência de resíduos de antibióticos – contendo $9,87 \pm 1,12$ % de umidade (Balança Ohaus MB25) foram adequadamente pesadas (Marca: Shimadzu AUX220) em frascos âmbar de 12 mL. A fim de avaliar o efeito da adição de sal na extração do analito, diferentes teores de NaCl PA (Alphatec) foram adicionados aos frascos contendo as amostras (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 g), as quais foram fortificadas com alíquotas da solução estoque para o procedimento de extração. Para cada teor de sal, a extração foi realizada em triplicata. Os frascos foram agitados em vórtex (Marca: Warmnest) a 2800 rpm durante 1 minuto para homogeneização da amostra. 8,0 mL de acetonitrila foram adicionados e então agitados a 2800 rpm durante 5 minutos. As amostras foram mantidas em freezer (-16°C) durante período superior a 16h (overnight). Logo após, uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi retirada e centrifugada (Marca: Eppendorf) a 5410 rpm durante 10 minutos. Após esse período, 1 mL do sobrenadante foi retirado e colocado em vials para análise. A proporção de sal que resultou na maior recuperação de tilosina foi adotada para os testes posteriores com cama de aviário proveniente de empresa de frangos de corte.

6.2.4. Validação da metodologia proposta

Os parâmetros descritos a seguir foram avaliados para ambos os métodos (Método HPLC-UV e Método HPLC-MS/MS) desenvolvidos para detectar e quantificar a tilosina. Para tanto, as determinações normativas descritas no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) e no Manual de Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Alimentação Animal e Drogas Veterinárias (MAPA, 2011), foram seguidos.

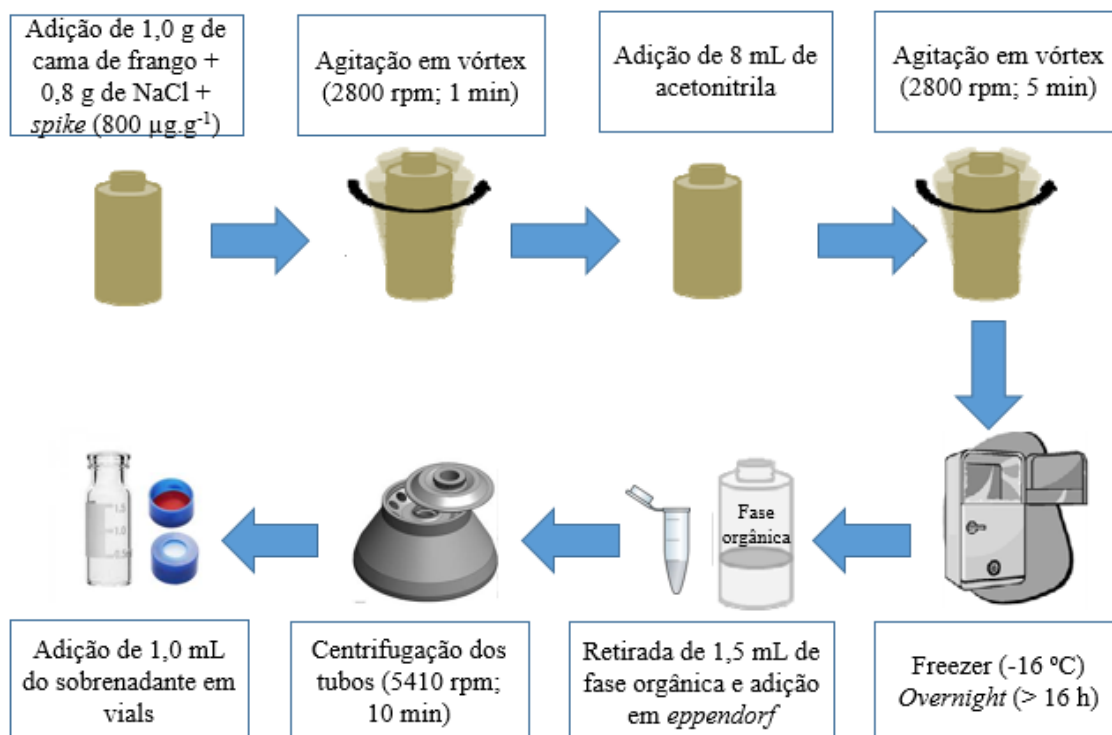


Figura 6.2: Procedimento de extração de tilosina em amostras de esterco de aves.

Faixa de trabalho e linearidade

Para o cálculo da faixa de trabalho, 6 curvas de calibração externa foram construídas utilizando-se solução padrão de tilosina com nove níveis de concentração (0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg.L⁻¹) para o método HPLC-UV, e com sete níveis de concentração (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg.L⁻¹) para o método HPLC-MS/MS. Foram realizadas seis réplicas para cada nível de calibração.

A linearidade do método foi determinada a partir da curva da faixa de trabalho e calculada a partir da equação da regressão linear. Para a confirmação da linearidade das curvas de calibração, o parâmetro homocedasticidade (homogeneidade das variâncias) foi verificada de acordo com o teste F (teste de Fisher/Snedecor) proposto por MAPA (2011). O teste consiste na comparação das maiores e menores variâncias na resposta instrumental dos níveis de calibração, segundo a Equação 6.1. O valor F_{calc} é comparado com o valor F_{tab} , para $n - 1 \geq 5$ graus de liberdade, em um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

$$F_{h,calc} = \frac{s_{yi,max}^2}{s_{yi,min}^2} \quad \text{Eq. (6.1)}$$

Em que ‘ $s^2 y_{i,\max}$ ’ e ‘ $s^2 y_{i,\min}$ ’ são, respectivamente, as maiores e menores variâncias das sextuplicatas das respostas instrumentais dos níveis de calibração.

Sensibilidade, limites de detecção (LD e LDM) e quantificação (LQ e LQM)

A sensibilidade foi determinada a partir da inclinação da curva na faixa de trabalho, e calculada de acordo com a Equação 6.2:

$$S = \frac{dy}{dx} \quad \text{Eq. (6.2)}$$

Em que, S = sensibilidade; dy = variação da resposta; dx = variação da concentração.

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento foram determinados segundo as especificações descritas no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), calculado a partir das curvas de calibração construídas e descritas nas Equações 6.3 e 6.4, respectivamente:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad \text{Eq. (6.3)}$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad \text{Eq. (6.4)}$$

Em que, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y das seis curvas de calibração construídas e IC = inclinação da curva de calibração de melhor ajuste. Os limites de detecção (LDM) e quantificação (LQM) do método foram calculados a partir dos valores de LD e LQ e levaram em conta a taxa de recuperação média do analito na matriz juntamente com o fator de concentração do procedimento de extração.

Precisão

A precisão do método (repetitividade) foi avaliada utilizando-se a curva de calibração externa na faixa de trabalho, e expressa em termos do coeficiente de variação (CV). A precisão intermediária dos métodos HPLC-UV e HPLC-MS/MS foram determinadas pela análise de seis réplicas da solução padrão 60 mg.L⁻¹ e 60 µg.L⁻¹ respectivamente, por três diferentes analistas (Analista 1, Analista 2 e Analista 3) em dias diferentes (Dia 1, Dia 2 e Dia 3), como determinado pelo MAPA (2011). O percentual relativo da variação foi expresso em termos do coeficiente de variação.

Robustez

O estudo da robustez foi realizado a fim de avaliar a influência de variações pequenas, porém possíveis, nas condições cromatográficas. Para o método HPLC-UV, a robustez foi checada pela variação dos parâmetros, como fluxo de fase móvel e comprimento de onda. O fluxo de fase móvel foi variado em $\pm 0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $1,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e o comprimento de onda em $\pm 2 \text{ nm}$ (278 nm e 282 nm). Para cada variação, foram realizadas seis réplicas da solução padrão $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para o método HPLC-MS/MS, a robustez foi checada pela variação dos parâmetros fluxo de fase móvel e *heat block* (HB). O fluxo foi variado em $\pm 0,02 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,18$ e $0,22 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e a temperatura do *heat block* variada em $\pm 10^\circ\text{C}$ (390°C e 410°C). Similarmente, em cada variação, foram analisadas seis réplicas da solução padrão de $80 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Exatidão, Seletividade e Efeito Matriz

Para o método HPLC-UV, a matriz (esterco de aves) foi fortificada com tilosina em 5 níveis de concentração (5, 20, 40, 60 e $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto para o método HPLC-MS/MS realizou-se a fortificação da matriz nos níveis de concentração 5, 20, 40, 80 e $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Em ambos os casos utilizou-se 6 réplicas em cada nível e a recuperação do analito em cada nível de estudo foi calculada de acordo com a Equação 6.5:

$$REC (\%) = \frac{A_a}{A_f} \times 100\% \quad \text{Eq. (6.5)}$$

Em que: A_a = área de tilosina na amostra dopada antes da extração da matriz; A_f = área de tilosina na amostra dopada após a extração da matriz.

Seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar o(s) analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem interferência de outros componentes de comportamento semelhante. A verificação da seletividade do procedimento analítico deve ser realizada comparando os sinais (resposta instrumental) do processamento da matriz, extrato da matriz fortificado/analito puro e digerido em solvente (MAPA, 2011). A determinação da seletividade foi realizada pela comparação da matriz controle com a matriz fortificada em 5 níveis de concentração, bem como com a solução padrão de tilosina nesses níveis.

Denomina-se efeito matriz o estudo da seletividade que objetiva investigar possíveis interferências causadas pelas várias substâncias que mascaram a amostra matriz, e isso leva, basicamente, à um decréscimo ou amplificação do sinal instrumental. Algumas técnicas instrumentais, como a cromatografia acoplada à espectrometria de massas, podem ser altamente seletivas, garantindo a identificação inequívoca do analito e nenhum ou quase nenhum efeito de

matriz. Nas análises LC-MS, o efeito da matriz é um parâmetro fundamental de verificação, uma vez que as fontes de ionização são muito suscetíveis aos efeitos dos interferentes da amostra (MAPA, 2011).

De acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011), o efeito matriz pode ser verificado comparando-se a curva de calibração externa (padrão analítico em solvente) e a curva de calibração matrizada, sextuplicatas em 5 níveis de concentração, e calculado pela Equação 6.6. Uma outra forma de avaliar o efeito matriz é aplicar o teste F (Fischer-Snedecor) de homogeneidade de variâncias para checar se as variâncias das amostras não-matriz (padrão analítico em solvente) e matriz (fortificada) podem ser consideradas estatisticamente iguais em cada nível de fortificação. Os níveis de fortificação adotados da tilosina foram 5, 20, 40, 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim o valor de F_{calc} (Equação 6.7) é comparado com o valor de F_{tab} , para $n - 1 \geq 5$ graus de liberdade, à um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

$$\text{Matrix Effect} = \frac{A_f - A_b}{A_p} \quad \text{Eq. (6.6)}$$

$$F_{\text{calc},i} = \frac{s_{i,1}^2}{s_{i,2}^2} \quad \text{Eq. (6.7)}$$

Em que: A_f = área de tilosina na amostra dosada após a extração da matriz; A_b = área de tilosina na matriz não-fortificada, i.e. branco ou amostra controle; A_p = área da tilosina em solução padrão (padrão analítico em solvente); ' $s^2_{i,1}$ ' e ' $s^2_{i,2}$ ' = sextuplicatas das variâncias das amostras não-matriz e matriz, em cada nível de concentração, respectivamente.

Na Equação 6.6, se o efeito matriz for 1,0, a matriz não possui efeito na acurácia do método. Porém, se for maior que 1,0, a matriz causa um aumento do sinal instrumental, enquanto se menor que 1,0, causa uma supressão no sinal. Em relação à Equação 7, se para um determinado nível de concentração i o valor de $F_{\text{calc},i}$ for menor que o F_{tab} , as variâncias desse nível de concentração podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz não tem efeito importante na precisão do método neste nível particular de fortificação. Por outro lado, se em um dado nível de concentração i o valor de $F_{\text{calc},i}$ for maior que F_{tab} , as variâncias desse nível de concentração não podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz tem um efeito importante na precisão do método (MAPA, 2011). Caso ocorra um efeito de matriz em pelo menos um nível de concentração, o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) recomenda o uso de curvas de calibração matrizadas para quantificar o analito de interesse.

6.2.5. Análise do teor de tilosina em cama de aviário proveniente de empresa avícola

Após a validação dos métodos analíticos propostos, procedeu-se a aplicação desses na análise de resíduos coletados em empresa produtora de frangos de corte, localizada em Minas Gerais, Brasil. A amostragem, via técnica de quarteamento, foi realizada em 2 galpões (boxes) da empresa, contendo, cada um, cerca de 17000 aves matrizes (poedeiras), sendo o primeiro galpão (R) na fase de recria (7 a 17 semanas de idade) e o 2º galpão (CG) na fase de produção (18 a 76 semanas de idade). A coleta de cerca de 2 kg de cama de aviário em cada box foi feita durante o período de aplicação do antibiótico tilosina às aves. Os resíduos foram transportados ao laboratório em coolers e armazenados em freezer (-16°C), até o preparo da amostra e análise. A Figura 6.3 mostra um esquema da granja avícola, destacando-se as unidades (galpões de recria e produção) onde foram realizadas as coletas.

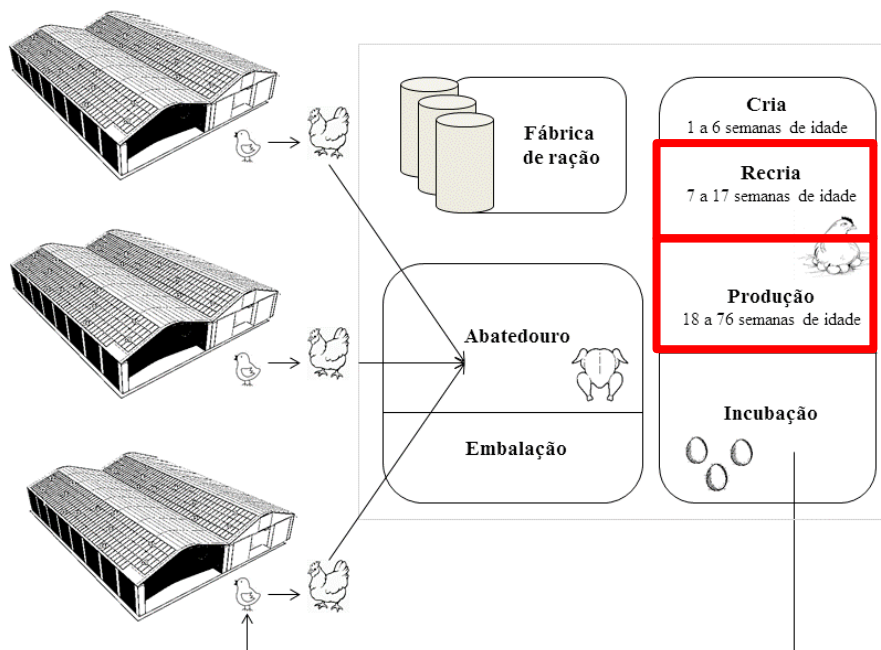


Figura 6.3: Esquema da granja avícola e unidades de coleta do resíduo.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Desenvolvimento e otimização dos métodos analíticos

Para otimizar as condições cromatográficas primeiramente para o sistema HPLC-UV, diferentes colunas (LiChrospher 100 HP RP-18 – 5 µm, 250 x 4 mm e Poroshell 120 EC-C₁₈ - 4 µm, 4.6 x 100 mm), fases móveis (0,05M NaH₂PO₄-H₃PO₄ : ACN (80:20 v v⁻¹) e ACN:H₂O (90:10 v v⁻¹)), fluxos (0,5, 1,0 e 1,5 mL.min⁻¹), temperaturas do forno (25°C, 30°C e 35°C) e volumes de injeção

(5 e 10 μL) foram testados. Uma vez que os parâmetros analíticos para o método HPLC-UV foram definidos, foi possível transferir algumas condições para o método HPLC-MS/MS, como coluna cromatográfica (Poroshell 120 EC-C18 – 4 μm , 4,6 x 100 mm), temperatura do forno (35°C) e volume de injeção (10 μL). Uma fase móvel similar contendo 0,1% de ácido fórmico (ACN:HCO₂H 0,1% - H₂O:HCO₂H 0,1%) foi usada para melhorar a ionização do analito, a qual possui grande influência na detecção de analitos ionizados por eletrospray. As condições cromatográficas otimizadas estão apresentadas na Tabela 6.1. Sob essas condições, o pico analítico obtido para a tilosina em cada método apresentou-se bem definido. O tempo de retenção (TR) da tilosina foi de 1,461 minutos para o método HPLC-UV e de 5,641 minutos para o método HPLC-MS/MS.

Neste estudo, a coluna Poroshel 120 EC-C18 foi preferida por causa de suas especificações intrínsecas, como tamanho de partícula (4 μm) e comprimento da coluna (100 mm). Partículas menores tendem a reduzir a altura dos pratos, obtendo um maior número de pratos e, portanto, sendo mais eficientes na separação cromatográfica, acelerando a transferência de massa entre a fase móvel e os poros das partículas devido à menor profundidade dos poros. Além disso, uma coluna menor permite separações mais rápidas, pois o tempo de separação é proporcional ao tamanho da coluna e usa menos solvente e volume de amostra (Maldaner et al., 2009).

Uma boa separação cromatográfica também depende do equilíbrio entre a ionização do soluto (analito) e as diferentes fases móveis utilizadas. A tilosina tem um pKa de 7,73 e o uso da fase móvel composta por 0,05 M NaH₂PO₄-H₃PO₄: ACN (80:20 v v⁻¹), com pH 2,28, fez com que ambos soluto e grupos silanol da fase estacionária da coluna fossem protonados assim, as interações hidrofóbicas e iônicas foram suprimidas. Assim, o uso de ACN: H₂O (90:10 v v⁻¹) como fase móvel para o método HPLC-UV e ACN: HCO₂H 0,1% - H₂O: HCO₂H 0,1% para o método HPLC-MS/MS garantiu que ambos os solutos e os grupos silanol fossem parcialmente ionizados de forma que a separação pode ter ocorrido devido às interações entre o soluto e os grupos silanol residuais (Borges et al., 2012).

Os demais parâmetros, como vazão da fase móvel, temperatura e volume de injeção da amostra, foram testados a fim de fornecer a melhor resolução cromatográfica para a tilosina, ou seja, evitar o espalhamento da amostra e, conseqüentemente, o alargamento do pico cromatográfico (Maldaner et al., 2009).

Tabela 6.1: Parâmetros cromatográficos otimizados para os métodos analíticos testados para análise de tilosina em cama de aviário

Parâmetros	Método HPLC-UV	Método HPLC-MS/MS
Curva de calibração	0,5 – 100 mg.L ⁻¹ (4 – 800 mg kg ⁻¹)	5 – 100 µg.L ⁻¹ (40 – 800 µg kg ⁻¹)
Eluição	Isocrática	Isocrática
Fase Móvel	Acetonitrila / água (90/10)	50% A: Acetonitrila / ácido fórmico (1%) 50% B: Água / ácido fórmico (1%)
Coluna	Poroshell 120 EC-C ₁₈ (4 µm, 100x4.6 mm)	Poroshell 120 EC-C ₁₈ (4 µm, 100x4.6 mm)
Fluxo	1,0 mL.min ⁻¹	0,2 mL.min ⁻¹
Comprimento de onda	280 nm	-
Linha de dessolvatação (DL)	-	250 °C
Heat Block (HB)	-	400 °C
Volume de injeção	10 µL	10 µL
Temperatura do forno	35°C	35°C
Tempo de retenção	1,461 minutos	5,641 minutos
Tempo de corrida	5,0 minutos	9,0 minutos
Íon precursor [M+H] ⁺	-	916,40 m/z
Íon produto m/z	-	173,65 m/z

6.3.2. Extração de tilosina a partir das amostras de cama de aviário

Inicialmente, o efeito da adição de sal (NaCl) à extração de tilosina foi verificado. Os resultados, expressos como a eficiência de recuperação de tilosina (%), estão apresentados na Tabela 1S do Material Suplementar. Para todos os teores de sal estudados, elevadas porcentagens de recuperação de tilosina, 80,52% a 95,74%, foram obtidos. A presença de força iônica dada pela adição de 0,8g de NaCl no meio aumentou a porcentagem de recuperação de tilosina em 14,4%. Esse efeito positivo, conhecido como salting-out, é resultado da solvatação de íons pelas moléculas de água, facilitando, deste modo, a migração da tilosina para a fase orgânica (Borges et al., 2012; Goulart et al., 2010). Portanto, esse conteúdo de sal foi fixado para todos os procedimentos de extração envolvendo a cama de aviário.

Alguns estudos de quantificação de tilosina em esterco avícola ou em solos que receberam esses dejetos tem sido reportados na literatura (Li et al., 2013; Ho et al., 2014; Berendsen et al., 2015; Widysari-Mehta et al., 2016; Wei et al., 2019). A maioria desses estudos utilizou extração em fase

sólida (SPE) com cartuchos C18 para a retirada do analito da matriz complexa (Berendsen et al., 2015; Widyasari-Mehta et al., 2016; Wei et al., 2019) e obtiveram eficiência de recuperação de 42,6 a 89%. Desta forma, percebe-se que o uso da LTPE, considerada uma técnica simples, de fácil uso e de baixo custo, proporciona recuperação de tilosina maior (ou equivalente) quando comparada à técnica clássica de SPE.

6.3.3. Validação dos métodos

Faixa de trabalho e linearidade

Os resultados da faixa de trabalho para os métodos desenvolvidos estão indicados na Tabela 6.2. Em ambos os métodos, as seis curvas de calibração externas (Figuras 6.1S e 6.2S do Anexo – item 6.6) resultaram em coeficiente de determinação (R^2) igual ou superior a 0,995, satisfazendo assim o critério mínimo aceitável estabelecido pela FDA (2007).

A verificação da linearidade das curvas, dada pelo teste de homocedasticidade, constatou que as respostas instrumentais são homocedásticas, uma vez que os valores F_{calc} para HPLC-UV (4,88) e HPLC-MS/MS (4,78) foram inferiores ao valor F_{tab} (5,05), para um nível de confiança de 95%. Além disso, os gráficos dos desvios-padrão em função das concentrações dos padrões de calibração (Figura 6.3S do Anexo) não indicaram comportamento sistemático, enfatizando a homocedasticidade dos dados.

Tabela 6.2: Faixa de trabalho e coeficiente de variação (CV), para seis réplicas em cada nível, para a análise de tilosina em cama de aviário.

Concentração (mg.L ⁻¹ / µg.L ⁻¹) ^a	Concentração (mg.kg ⁻¹ / µg.kg ⁻¹) ^a	Método HPLC-UV		Método HPLC-MS/MS	
		Área Média	CV (%)	Área Média	CV (%)
0,5	4	1977,83	3,757	-	-
1	8	4233,83	1,730	-	-
5	40	23814,17	1,120	5629,00	2,519
10	80	48262,67	0,812	7221,00	3,244
20	160	96179,00	0,648	17289,00	2,295
40	320	190558,33	0,384	37790,83	1,423
60	480	283787,50	0,394	56569,50	1,461
80	640	376455,67	0,227	80162,17	1,130
100	800	462053,17	0,263	92935,67	0,719

^a A faixa de trabalho para o método HPLC-UV é dado em mg.L⁻¹ (ou mg.kg⁻¹) e para HPLC-MS/MS é µg.L⁻¹ (ou µg.kg⁻¹)

Sensibilidade, limite de detecção (LD e LDM) e limite de quantificação (LQ e LQM)

A sensibilidade da metodologia desenvolvida para a análise de tilosina foi estimada utilizando-se a curva de regressão linear, como sendo 4628,25 L.mg⁻¹ para o método HPLC-UV e de 924,06 L.µg⁻¹ para o método HPLC-MS/MS.

A Tabela 6.2S, no Anexo (item 6.6), mostra os resultados de LD, LDM, LQ e LQM para a análise de tilosina em ambos os métodos. O cálculo dos valores de LD e LQ foi realizado com os dados das seis curvas de calibração externas construídas conforme as equações 3 e 4. No método HPLC-UV, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados em 0,105 mg.L⁻¹ e 0,349 mg.L⁻¹, respectivamente, enquanto no método HPLC-MS/MS, obteve-se valores de LD e LQ bem menores, de 0,841 µg.L⁻¹ e 2,802 µg.L⁻¹, respectivamente. A diferença dos valores obtidos para LD e LQ entre os dois métodos refletem a sensibilidade entre os dois tipos de detectores (UV e MS). O detector de absorvância no UV Visível é o detector de HPLC mais utilizado atualmente, aplicável para análises de compostos que absorvem na região do UV ou visível (de 190 a 600 nm). No entanto, este detector é limitado a analisar compostos cromóforos e a resposta tende a ser amplamente variável para diferentes solutos. O detector MS, por sua vez, é um detector universal com alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar analitos na ordem da pg (Swartz et al., 2010). Isso é confirmado pelos limites estimados de detecção (LDM) e quantificação (LQM) do método HPLC-UV que foram 0,837 mg.kg⁻¹ e 2,781 mg.kg⁻¹, enquanto para o HPLC-MS/MS método foram muito menores, ou seja, 6,324 µg.kg⁻¹ e 21,116 µg.kg⁻¹, respectivamente.

Li et al. (2013) quantificaram tilosina e outros 13 antibióticos veterinários usando cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodos (HPLC-UV-DAD), e alcançou limites de detecção de método (LDM) inferiores a 100 µg.kg⁻¹, exceto para tetraciclina. Ho et al. (2014) alcançaram LDM de 3 µg.kg⁻¹ e 1 µg.kg⁻¹ para análise de tilosina em solo e esterco de frango, respectivamente, enquanto os valores de LQM foram de 9 µg.kg⁻¹ e 4 µg.kg⁻¹, que foi inferior aos valores obtidos neste estudo. Por outro lado, Berendsen et al. (2015) usando espectrômetro de massa como detector encontrou LDM de 20 µg.kg⁻¹ para análise de tilosina em esterco de suíno, que foi maior do que o LDM (6,324 µg.kg⁻¹) alcançado com o método HPLC-MS/MS neste estudo.

Precisão

A precisão na faixa de trabalho é apresentada na forma de repetitividade (Tabela 6.2) sendo avaliado o desvio padrão dos resultados obtidos para seis réplicas em cada nível. Nesta tabela, pode-se notar que os resultados para os coeficientes de variação (CV) ficaram compreendidos entre 0,227% e 3,757% para o método HPLC-UV e entre 0,719% e 3,244% para o método HPLC-MS/MS. Tais valores são satisfatórios, uma vez que são inferiores a 5%, que é o limite máximo aceitável pela ANVISA (2012) e pelo MAPA (2011).

A precisão intermediária dos métodos HPLC-UV e HPLC-MS/MS foi determinada pela análise de seis réplicas da solução padrão de 60 mg.L⁻¹ e 60 µg.L⁻¹, respectivamente, por três analistas (Analista 1, Analista 2 e Analista 3) em três dias diferentes (Dia 1, Dia 2 e Dia 3). Os coeficientes de variação encontrados entre analistas foi 0,96% para o método HPLC-UV e 4,75% para o método HPLC-MS/MS, os quais são inferiores a 5%, atendendo aos critérios das agências regulatórias brasileiras (Tabela 6.3S do Anexo – item 6.6). Widyasari-Mehta et al. (2016) verificaram, em seu método de análise de tilosina em solos que receberam esterco de aves, valores de desvio padrão de até 27%, indicando que o método desenvolvido no presente estudo tem maior precisão.

Robustez

O coeficiente de variação máximo observado para todas as alterações em relação ao método original foi de 6,71% (Tabela 6.4S) para o método HPLC-UV, enquanto que para o método HPLC-MS/MS, tal valor foi de 3,27% (Tabela 6.5S). Apesar de o MAPA (MAPA, 2011) não especificar limite de aceitação da robustez, considera-se que os métodos propostos apresentaram robustez satisfatória, visto que apresentaram coeficientes de variação, entre o método original e as alterações propostas, inferiores a 10%.

Exatidão, Seletividade e Efeito Matriz

Tabela 6.3 mostra os resultados de recuperação de tilosina em amostras de cama de aviário controle, fortificadas em 5 níveis com solução padrão de tilosina, bem como a verificação do efeito matriz para o método HPLC-MS/MS. Para esse estudo, as porcentagens de recuperação variaram de 85,94% a 112,91% para o método HPLC-UV e 74,96% a 110,99% para o método HPLC-MS/MS, o que é considerado satisfatório segundo a FDA (2007), que determina os limites de recuperação do analito entre 80% e 120%, e segundo o MAPA (2011), cujo critério de aceitação da recuperação é de 80% a 110%.

Wei et al. (2019), ao analisar tilosina em solo adubado com esterco avícola, alcançaram recuperações na faixa de 42,6 a 84,3%. Ho et al. (2014) obtiveram recuperação de 89% para tilosina em esterco avícola, assim como Li et al. (2013), que chegaram na recuperação máxima de 85,3% de tilosina. Vale ressaltar que os artigos mencionados utilizaram o cartucho de extração Oasis HLB, tendo como solventes extratores metanol, acetonitrila e/ou tampão EDTA-McIlvaine. Tais resultados, evidenciam a simplicidade e aplicabilidade do método desenvolvido no presente trabalho, que utiliza a Partição em Baixa Temperatura (LTPE) como técnica de extração e apenas acetonitrila como solvente.

A seletividade da tilosina na cama de aviário foi verificada de forma simultânea à determinação da exatidão. Ambos os métodos se apresentaram seletivos e específicos à tilosina

(Figuras 6.4S e 6.5S, no Anexo – item 6.6). O cálculo do efeito da matriz dado pela equação 6.6 mostra que, exceto para o nível de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ ($640 \mu\text{g kg}^{-1}$), cujo valor de F_{calc} foi inferior a F_{tab} (5,05, nível de confiança de 95%), em todas os demais níveis de concentração, a matriz teve grande influência na precisão do método HPLC-MS/MS. A Tabela 3 mostra que para o nível mais baixo da faixa de trabalho ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$), a supressão do sinal foi de -21%, enquanto para os outros níveis, o aumento do sinal variou de 10 a 14%. Resultados semelhantes foram relatados por Widyasari-Mehta et al. (2016) na análise de antibióticos em esterco de porco e digeridos.

Além disso, a Figura 6.6S (Anexo – item 6.6) mostra que ambas 'curva de calibração externa (padrão analítico em solvente)', 'curva de calibração matrizada (dosagem antes da extração)' e 'curva de calibração matrizada (dosagem após extração)' exibiram coeficientes angulares diferentes. Por esse motivo, a quantificação de tilosina em amostras de cama de aviário da empresa de frangos de corte foi realizada usando a "curva de calibração matrizada (dosagem antes da extração)", que já leva em consideração a eficiência da recuperação de tilosina do procedimento de extração usado.

Tabela 6.3: Recuperações de tilosina na cama de aviário (%), com o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (CV) para seis réplicas em cada nível.

Método	Parâmetros	Níveis de fortificação				
		5 mg.L^{-1}	20 mg.L^{-1}	40 mg.L^{-1}	60 mg.L^{-1}	80 mg.L^{-1}
HPLC-UV	Média	102,59	85,94	86,35	110,19	112,91
	SD	12,83	2,43	2,86	21,91	30,47
	CV (%)	12,51	2,83	3,31	19,88	26,99
HPLC-MS/MS		$5 \mu\text{g.L}^{-1}$	$20 \mu\text{g.L}^{-1}$	$40 \mu\text{g.L}^{-1}$	$80 \mu\text{g.L}^{-1}$	$100 \mu\text{g.L}^{-1}$
	Média	87,02	119,80	96,45	87,48	80,88
	SD	7,84	5,07	6,30	2,34	3,22
	CV (%)	9,01	4,24	6,53	2,68	3,98
	F_{calc}^a	5,40	13,05	22,12	1,73	32,66
Efeito Matriz	0,79 (-21%)	1,14 (+14%)	1,14 (+14%)	0,99 (-1%)	1,10 (+10%)	

^a $F_{\text{tab}} = 5,05$ (5; 5; 95%)

6.3.4. Análise do teor de tilosina em cama de aviário proveniente de empresa avícola

O método HPLC-MS/MS desenvolvido e validado no presente trabalho foi utilizado para a determinação de tilosina em amostras de camas de aviário coletadas em galpões de recria e produção, como mostra a Tabela 6.4.

Na fase de recria obteve-se concentração média de tilosina de $135,22 \mu\text{g.kg}^{-1}$ enquanto que na fase de produção foi de $264,92 \mu\text{g.kg}^{-1}$. A diferença na concentração de tilosina encontrada nos dois pontos de coleta pode ser resultado do período de aplicação do antibiótico no animal (tempo de tratamento), que é maior na fase de produção, devido ao ganho de tamanho e peso. Como

consequência, é esperado maior concentração de tilosina nos resíduos provindos do galpão de produção.

Tabela 6.4: Teores de tilosina encontrados nas amostras das fases recria e produção para 10 réplicas.

Réplicas	Fase de Recria			Fase de Produção		
	Área	Tilosina ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	TR (min)	Área	Tilosina ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	TR (min)
1	18143	159,89	5,435	29948	257,71	5,557
2	16275	144,41	5,442	31374	269,52	5,402
3	18476	162,65	5,466	25237	218,67	5,399
4	15604	138,85	5,433	34979	299,39	5,533
5	17509	154,64	5,428	31239	268,40	5,396
6	18359	161,68	5,43	28278	243,87	5,406
7	15625	139,03	5,429	29855	256,94	5,550
8	18402	162,04	5,428	32136	275,84	5,398
9	17910	157,96	5,423	27944	241,10	5,388
10	17371	153,49	5,145	22781	305,34	5,391
Média (n=10)	17367,4	153,46	5,406	29377,1	263,68	5,442
Teor real*	-	146,09	-	-	251,02	
SD (n=10)	1132,2	9,38	0,092	3510,5	26,29	0,073
CV (%)	6,52	6,11	1,71	11,95	9,97	1,33

*Considerando a recuperação média do método de 95,2%.

Na literatura, poucos estudos foram conduzidos visando a quantificação da tilosina em esterco animal, como aves, bovinos e suínos, ou em solos onde foi aplicado esterco animal. A Tabela 6.5 compara os diferentes métodos usados para quantificar a tilosina neste tipo de amostra. É possível observar que, embora os limites de detecção (LDM) e quantificação (LQM) dos métodos encontrados neste estudo sejam bastante elevados, LDM e LQM são suficientemente aplicáveis na quantificação de tilosina em dejetos de aves ou em amostras de cama de frango, e são semelhantes aos resultados relatados por Li et al. (2013) e Ho et al. (2014). Além disso, a alta recuperação de tilosina encontrada neste estudo (75 - 110%) coincide com as recuperações relatadas por outros trabalhos publicados, mostrando a viabilidade do uso da técnica de extração por partição em baixa temperatura para análise de tilosina em amostras complexas como cama de frango.

É importante destacar a ausência de legislação que estabeleça os limites máximos de tilosina e outros antibióticos em resíduos destinados à aplicação agrícola. Porém, no caso de produtos de origem animal para consumo humano, o MAPA (2018) publicou recentemente um Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (Instrução Normativa SDA nº 20, de 26 de

julho de 2018), que define, como Limites Máximos Permitidos de tilosina, as concentrações de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para tecidos musculares e renais em aves; 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ em ovos; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ no leite e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ no mel.

Li et al. (2013) quantificaram 14 antibióticos veterinários, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, incluindo a tilosina. Nas amostras de esterco avícola, suíno e bovino analisadas, o antibiótico esteve presente em 16,7; 22,2 e 16,7%, respectivamente. Para o esterco avícola, a concentração de tilosina esteve na faixa de 230 a 340 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo estes valores condizentes com os encontrados no atual estudo. Ho et al. (2014) avaliaram a presença da tilosina em esterco aviário e em solo no qual o resíduo foi aplicado como fertilizante, verificando, por sua vez, concentrações de 100 a 13740 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ do antibiótico no esterco e de 6 a 679 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ no solo.

Vale destacar que a concentração de tilosina residual quantificada nas amostras não são necessariamente relacionadas com as dosagens aplicadas aos animais, uma vez que o antibiótico pode ser metabolizado pelas aves e, se excretado na forma original, pode sofrer degradação na cama de aviário durante o tempo em que o animal fica confinado no galpão. Porém, tendo em vista os resultados obtidos na literatura e as quantificações feitas a partir do método desenvolvido neste estudo, verifica-se a sua aplicabilidade para a quantificar tilosina em cama de aviário e subsidiar análises de risco associadas ao gerenciamento de tal resíduo.

Tabela 6.5: Diferentes métodos reportados na literatura para a quantificação de tilosina em solos e amostras de esterco

Amostra	País	Ocorrência Tilosina ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Método de detecção	LDM / LQM ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Recuperação de tilosina (%)	Referência
Solo fertilizado com esterco de animais	China	0,48 – 2,46 ^a	SPE-HPLC-MS/MS	n.a.	42.6 – 84.3	Wei <i>et al.</i> ³⁵
Esterco bovino		220 – 280	SPE-HPLC-PDA	< 100 / n.a.	79.6 - 85.3	Li <i>et al.</i> ³¹
Esterco de aves		230 – 340				
Esterco suíno		230 - 1880				
Solo fertilizado com esterco de animais	Malásia	6 – 679	SPE-HPLC-MS/MS	3 / 9	103	Ho <i>et al.</i> ³²
Esterco de aves		100 - 13740		1 / 4	89	
Esterco suíno	Holanda	43 - 7700	SPE-HPLC-MS/MS	20 / n.a.	70 - 110	Berendsen <i>et al.</i> ³³
Esterco suíno	Alemanha	6400	SPE-HPLC-MS/MS	10 / n.a.	n.a.	Widyasari-Mehta <i>et al.</i> ³⁴

*Análise no vegetal; PDA – arranjo de diodos; n.a. – não disponível

Levando-se em conta o estado da arte na quantificação de tilosina em resíduo agroindustrial, salienta-se o ineditismo do presente estudo, já que foi desenvolvido um método simples,

relativamente rápido e de baixo custo para a extração de tilosina de uma matriz complexa (cama de aviário = esterco de aves + resíduo lignocelulósico) que tem sido utilizada como fertilizante de pastos e/ou ração animal.

6.4. Conclusão

Tendo em vista a importância da detecção e quantificação de antibióticos em resíduos agroindustriais utilizados como fertilizantes, o presente trabalho desenvolveu e validou um método relativamente fácil, simples e barato para a extração de tilosina de cama de aviário usando LTPE seguido por análise em HPLC-UV ou HPLC-MS/MS. Os métodos apresentaram linearidade adequada ($R^2 > 0,995$), precisão ($CV < 5\%$), robustez ($CV < 10\%$) e recuperação ($R > 75\%$), com limites de detecção ($6,32 \mu\text{g kg}^{-1}$) e de quantificação ($21,12 \mu\text{g kg}^{-1}$) compatíveis com a análise de tilosina em amostras ambientais, que podem subsidiar análises de risco e estratégias de gerenciamento de resíduos da atividade avícola.

6.5. Referências

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/>.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RDC nº 27 de 17 de maio de 2012.
- Angenent, L. T., Mau, M., George, U., Zahn, J. A., & Raskin, L. Effect of the presence of the antimicrobial tylosin in swine waste on anaerobic treatment. *Water Research*. v. 42, p. 2377–2384, 2008
- AVIMIG (2019) Associação dos Avicultores de Minas Gerais. Disponível em: www.avimig.com.br. Acesso em 24/04/2019.
- De Barros, A. L. C., Schmidt, F. F., de Aquino, S. F., & Afonso, R. J. de C. F. (2018). Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(20), 19962–19974.
- Borges, E. M., Goraieb, K., Collins, C. H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. *Quim. Nova*, 35, 993 (2012). doi: 10.1590/S0100-40422012000500024.
- Costa, R. P., Spisso, B. F., Pereira, M. U., Monteiro, M. A., Ferreira, R. G., Carlos, B. S., Oliveira, A. C. Tilosina: um importante antibiótico não monitorado em leite no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*. 20, 245 (2013). doi: 10.20396/san.v20i2.8634601
- EMBRAPA (2019) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: www.embrapa.br. Acesso em 24/04/2019.
- FDA - Food And Drug Administration. Ora Laboratory Procedure. Methods, method verification. Rockville, 2003. Disponível em: <http://web.ora.fda.gov/dfs/policies/manuals/default.html>. Acesso em: 09 de agosto de 2007.
- Gomes, R. P., Pena, C. B., Rezende, J., Coutrim, M. X., Afonso, R. J. C. F. Validation of a new high-throughput method to determine urinary S-phenylmercapturic acid using low-temperature partitioning extraction and ultra high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J Sep Sci*. 40, 550 (2017). doi: 10.1002/jssc.201600540.

- Goulart, S. M., Alves, R. D., Neves, A. A., de Queiroz, J. H., de Assis, T. C., de Queiroz, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. *Analytica Chimica Acta*, 671, 41 (2010). doi:10.1016/j.aca.2010.05.003
- Horie, M., Saito, K., Ishii, R., Yoshida, T., Haramaki, Y., & Nakazawa, H. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 812, p. 295–302, 1998.
- Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2008.
- Leal, R. M. P., Figueira, R. F., Tornisiolo, V. L., & Regitano, J. B. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 432, p. 344–349, 2012.
- Loke, M., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., & Tjørnelund, J. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography, *Chemosphere*, v. 40, p. 759–765, 2000.
- Maia, M. R., Arcanjo, A. L. P., Pinho, G. P., & Silvério, F. O. (2017). Solid-Liquid Extraction with Low Temperature Purification Coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry for Determination of Polychlorinated Biphenyls in Sewage Sludge. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(1), 179–186.
- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica – Alimentação animal e drogas veterinárias. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2011.
- MAPA (2018) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 171, de 13 de Dezembro de 2018.
- MAPA (2018) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 20, de 26 de Julho de 2018.
- Magalhães, E. J., Nascentes, C. C., Augusti, R., de Queiroz, M. E. L. R., da Silva, J. C. C., Afonso, R. J. C. F. Fast Determination of Benzodiazepines in Human Urine via Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and LC-HRMS. *J. Anal. Chem.*, 3, 118 (2012). doi: 10.4236/ajac.2012.32017.
- Maldaner, L., Jardim, I. C. S. F. The state of art of ultra performance liquid chromatography. *Quim. Nova*, 32, 214 (2009). doi: 10.1590/S0100-40422009000100036.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., & Gans, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, v. 148, n. 2, p. 570–579, 2007.
- Maštovská, K., Lehotay, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J. Chromatogr. A* 1040, 259 (2004). doi: 10.1016/j.chroma.2004.04.017.
- Ok, Y. S., Kim, S.-C., Kim, K.-R., Lee, S. S., Moon, D. H., Lim, K. J., Yang, J. E. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 174, n. 1–4, p. 693–701, 2011.
- Palermo-Neto, J., Almeida, R. T., Spinoza, H., Górnaiak, S., & Bernardi, M. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 641–658, 2006.
- Pinheiro, A., Rosa Albano, R. M., Alves, T. C., Kaufmann, V., & Da Silva, M. R. Veterinary antibiotics and hormones in water from application of pig slurry to soil. *Agricultural Water Management*, v. 129, p. 1–8, 2013.

- Prado, N., Ochoa, J., & Amrane, A. Biodegradation and biosorption of tetracycline and tylosin antibiotics in activated sludge system. *Process Biochemistry*, v. 44, n. 11, p. 1302–1306, 2009.
- Rodrigues, R. P., Farias, W. R., Goulart, S. M., Goulart, A. C., Santos, J. P. V., Queiroz, E. L. R. Otimização da Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura para Determinação de Carbofurano em Cucurbita Pepo L (“Abobrinha”) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *Quim. Nova* 2, 213 (2018).
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, v. 65, n. 5, p. 725–759, 2006.
- Sismotto, M., Augusto, J., & Paschoal, R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 449–461, 2013.
- Spisso, B. F., Ferreira, R. G., Pereira, M. U., Monteiro, M. A., Cruz, T. Á., Pinto, R., Wanderley, A. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. *Analytica Chimica Acta*. v. 682, p. 82–92, 2010.
- Stone, J. J., Clay, S. A., & Spellman, G. M. Tylosin and chlortetracycline effects during swine manure digestion: Influence of sodium azide. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 9515–9520, 2010.
- Swartz, M. HPLC detectors: a brief review. *J Liq Chromatogr R T* 33, 1130 (2010). doi:10.1080/10826076.2010.484356
- Teeter, J. S., & Meyerhoff, R. D. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research*, v. 93, p. 45–51, 2003.
- Thompson, T. S., Noot, D. K., Calvert, J., & Pernal, S. F. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1020, p. 241–250, 2003.
- Zhao, L., Dong, Y. H., & Wang, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 5, p. 1069–1075, 2010.
- Wei, R.; He, T.; Zhang, S.; Zhu, L.; Shang, B.; Li, Z.; Wang, R. Occurrence of seventeen veterinary antibiotics and resistance bacterias in manure-fertilized vegetable farm soil in four provinces of China. *Chemosphere*, v. 215, p. 234-240, 2019.
- Li, Y.X., Zhang, X.L., Li, W., Lu, X.F., Liu, B., Wang, J. The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces. *Environ. Monit. Assess.* v. 185, p. 2211–2220, 2013.
- Ho, Y.B.; Zakaria, M. P.; Latif, P.A.; Saari, N. Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agricultural soil in Malaysia. *Science of the Total Environment*, v. 488-489, p. 261-267, 2014.
- Berendsen, B.J.A., Wegh, R.S., Memelink, J., Zuidema, T., Stolker, L.A.M. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*, v. 132, p. 258–268, 2015.
- Widyasari-Mehta, A., Hartung, S., Kreuzig, R. From the application of antibiotics to antibiotic residues in liquid manures and digestates: a screening study in one European center of conventional pig husbandry. *J. Environ. Manag.* v. 177, p. 129–137, 2016.
- World Health Organization (WHO) <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/antibiotics-animalseffectiveness/en/>>

6.6. Anexos

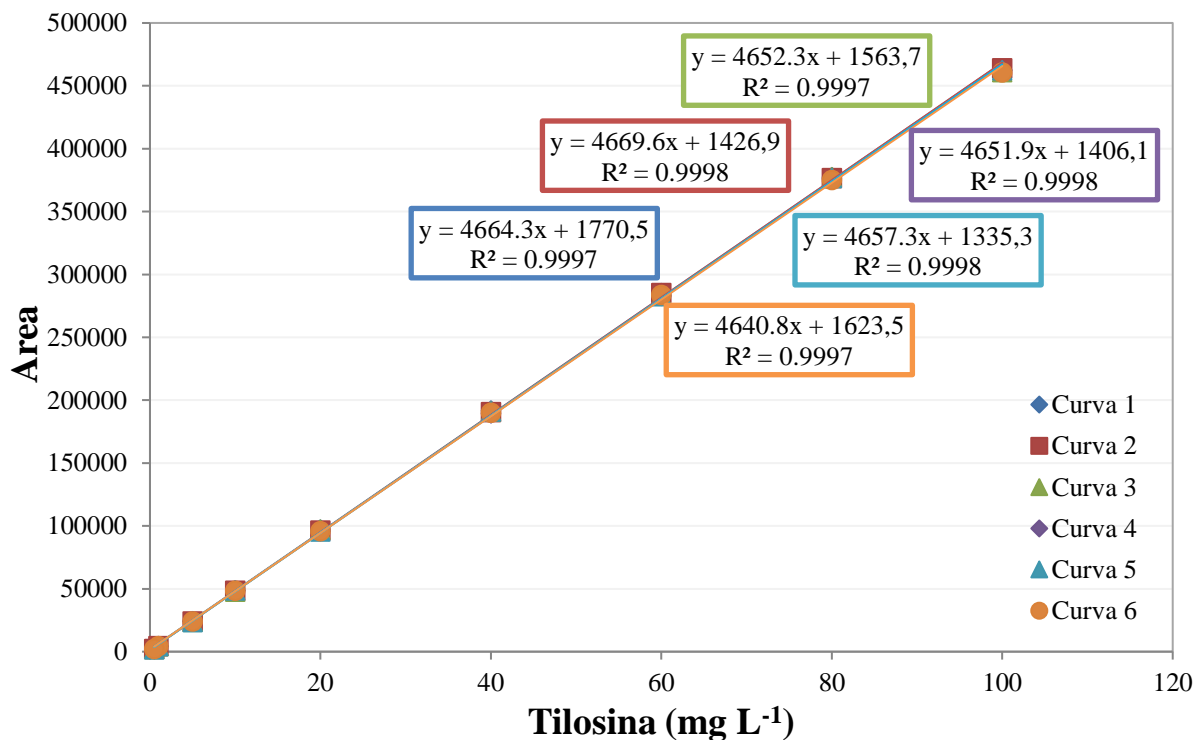


Figura 6.1S. Linearidade e intervalo de trabalho para o método HPLC-UV na determinação de tilosina.

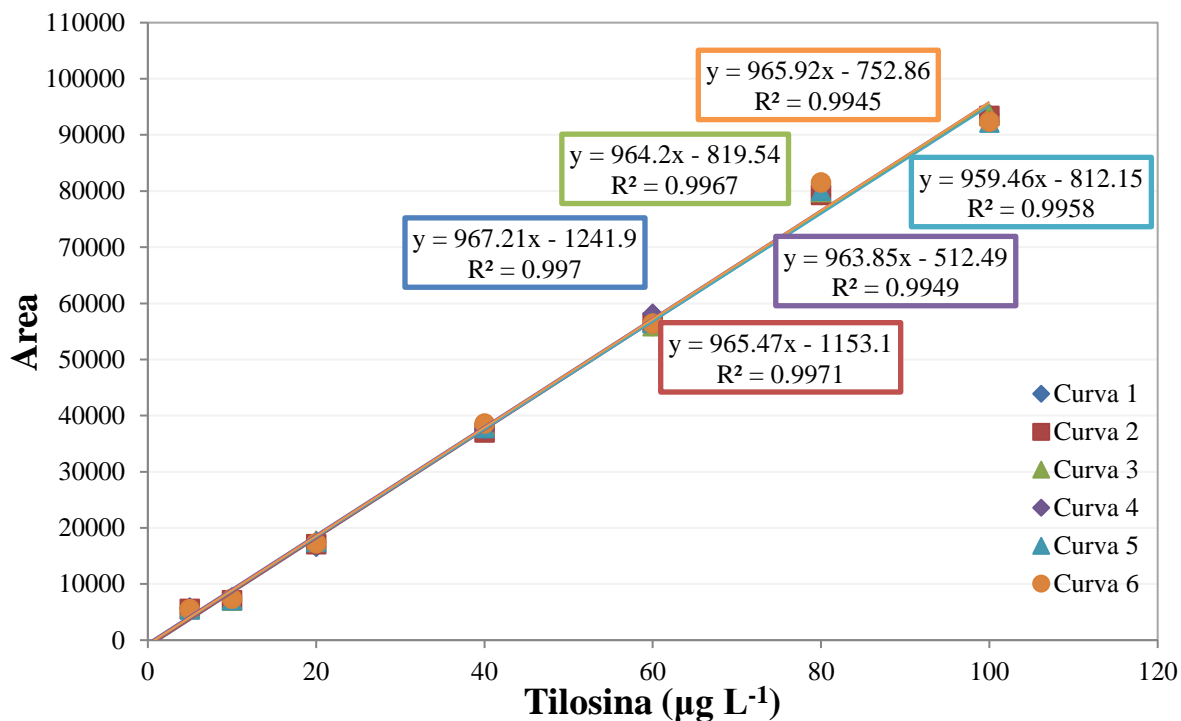


Figura 6.2S. Linearidade e intervalo de trabalho para o método HPLC-MS/MS na determinação de tilosina.

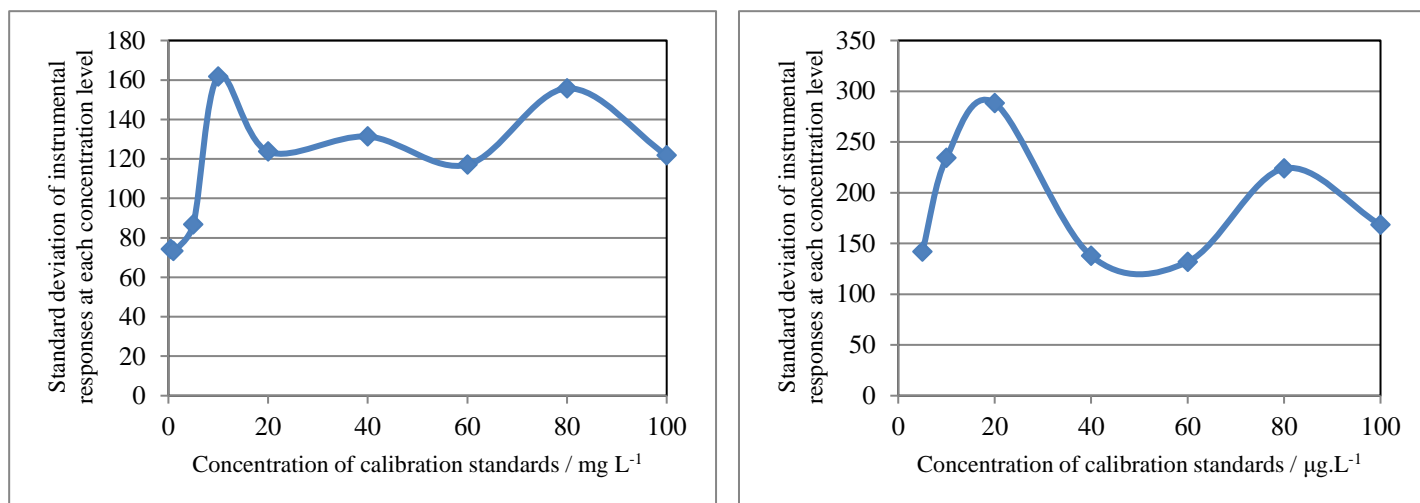


Figura 6.3S. Gráficos dos desvios-padrão das respostas das réplicas em cada nível de concentração como função da concentração nas soluções-padrão de calibração para os métodos (a) HPLC-UV e (b) HPLC-MS/MS.

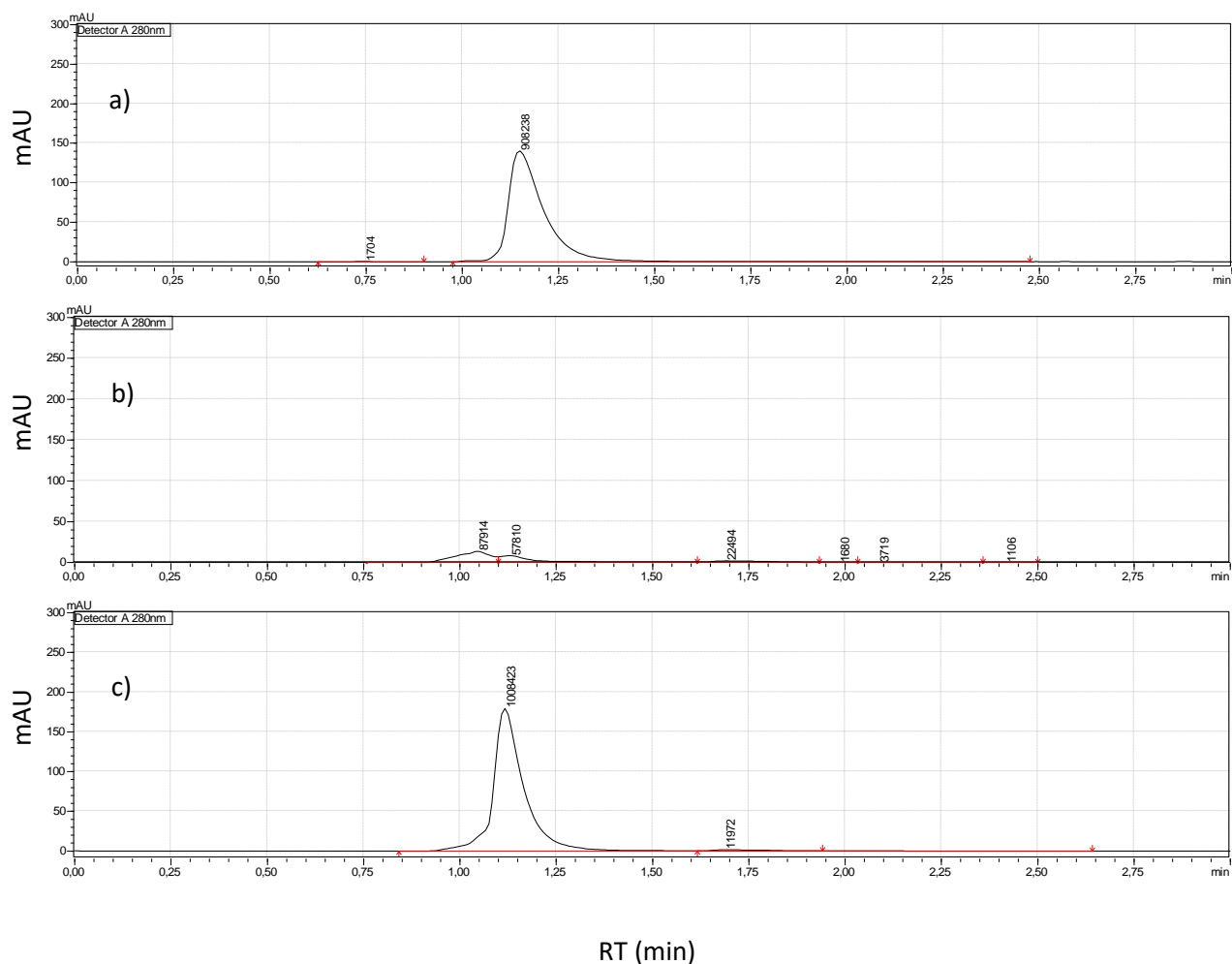


Figura 6.4S. Cromatograma da (a) solução-padrão em 80 mg L⁻¹, (b) amostra branca (matriz não-fortificada) e (c) matriz fortificada em 80 mg L⁻¹, a partir do método HPLC-UV.

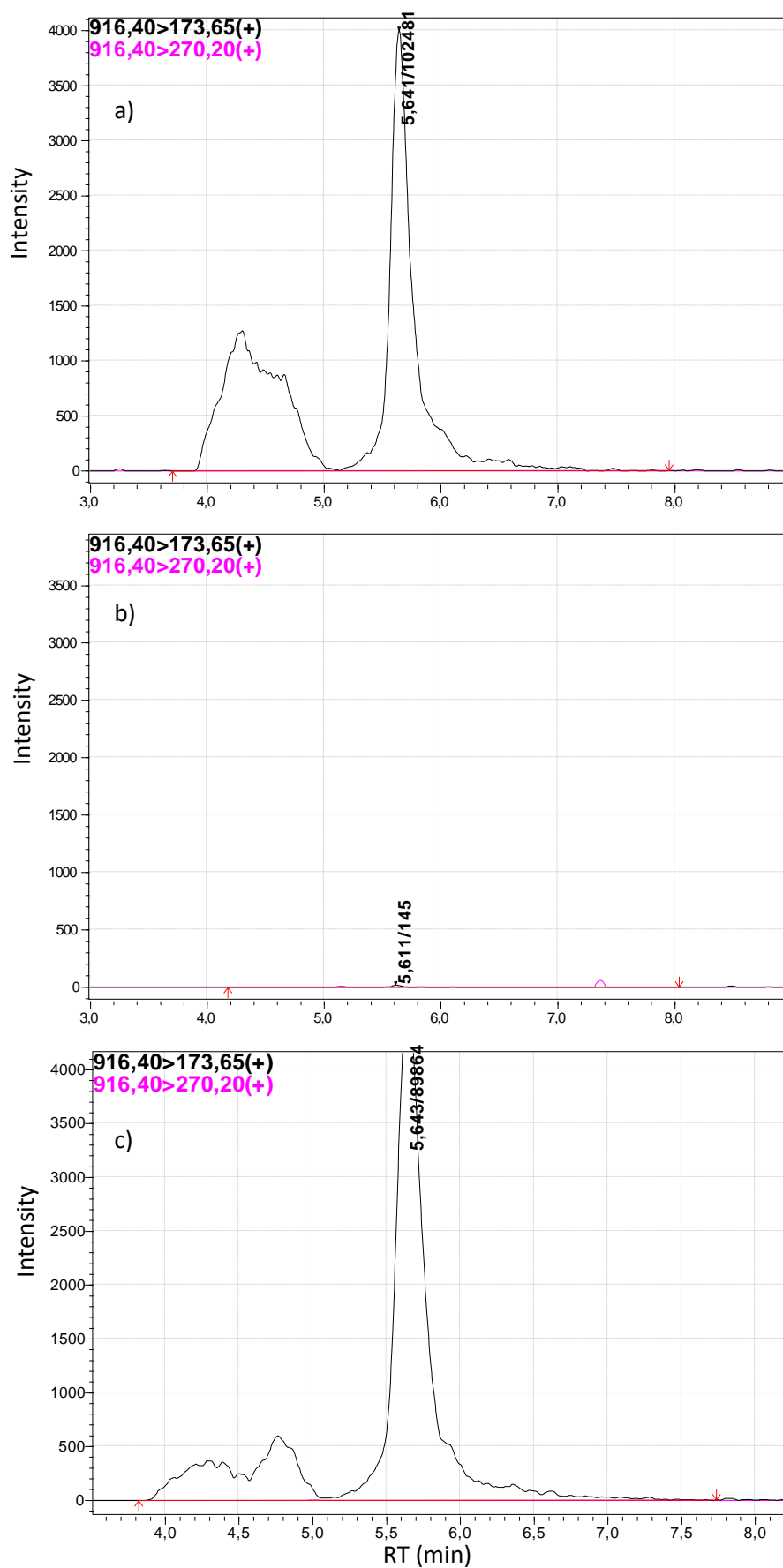


Figura 6.5S. Cromatograma da (a) solução-padrão em $80 \mu\text{g L}^{-1}$, (b) amostra branca (matriz não-fortificada) e (c) matriz fortificada em $80 \mu\text{g L}^{-1}$, a partir do método HPLC-MS/MS.

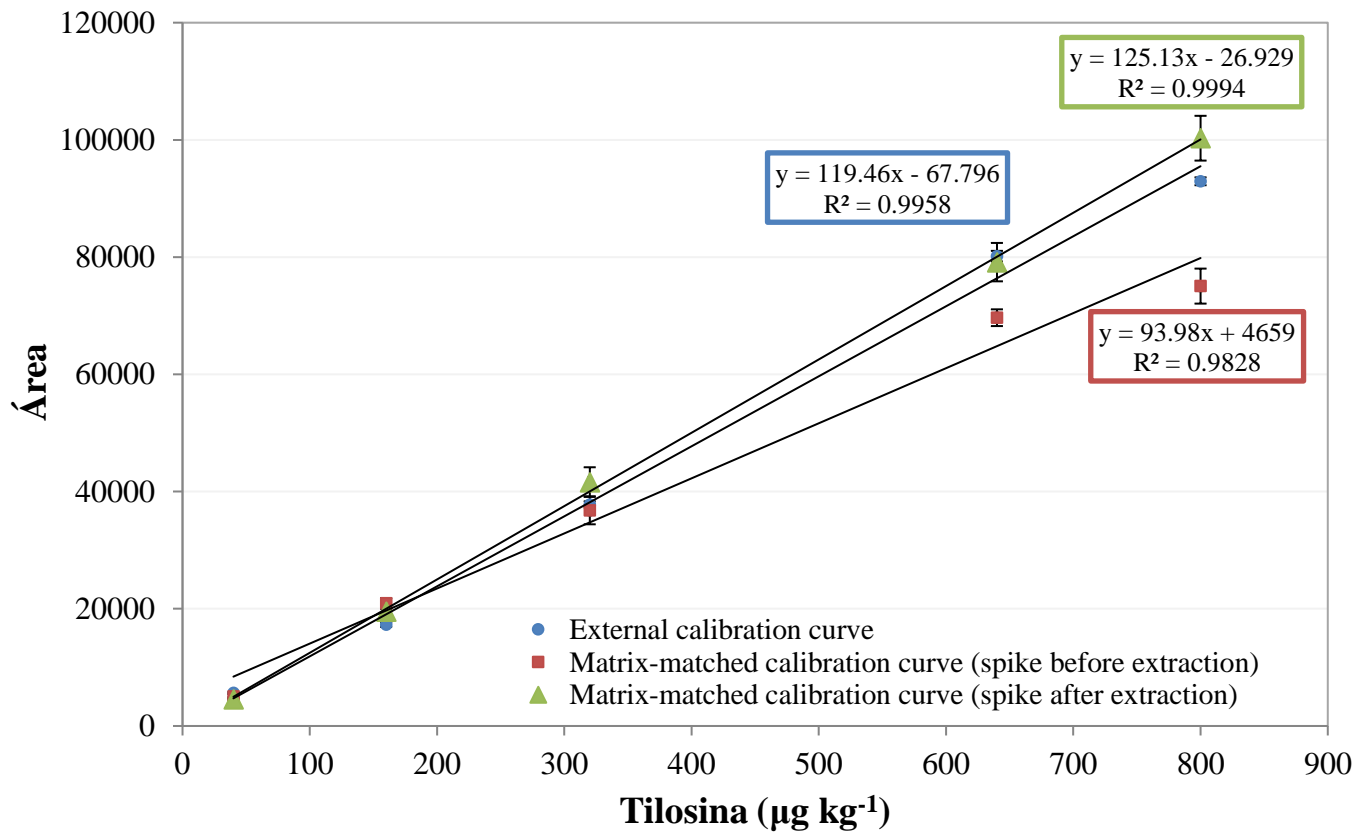


Figura 6.6S: Ocorrência de efeito matriz na cama de aviário no método HPLC-MS/MS.

Tabela 6.1S. Eficiência de recuperação de tilosina (%) para a cama de aviário como função do conteúdo de sal adicionado.

Parâmetro		NaCl (g)					
		0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Area	Média	395264	382808	383836	418880	452885	406814
	SD ^a	30403.54	3285.12	6115.51	9533.71	10566.71	4984.79
	CV ^a (%)	7.69	0.86	1.59	2.28	2.33	1.23
Recuperação (%)	Média	83.69	80.52	81.35	88.31	95.74	84.57
	SD	6.58	0.71	1.32	2.06	2.29	1.08
	CV (%)	7.86	0.88	1.63	2.34	2.39	1.28

^a Desvio-padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) para as triplicatas em cada teor de sal.

Tabela 6.2S. Parâmetros usados para calcular os limites de detecção e quantificação de tilosina nos métodos HPLC-UV e HPLC-MS/MS.

Método	Curva de calibração	a	b	R ²	DP _a	LD	LDM ^a	LQ	LQM ^a
HPLC-UV	1	4664.3	1770.5	0.9997	161.94	0.105 mg.L ⁻¹	0.837 ^a mg.kg ⁻¹	0.349 mg.L ⁻¹	2.781 ^a mg.kg ⁻¹
	2	4669.6	1426.9	0.9998					
	3	4652.3	1563.7	0.9997					
	4	4651.9	1406.1	0.9998					
	5	4657.3	1335.3	0.9998					
	6	4640.8	1623.5	0.9997					
HPLC-MS/MS	1	967.21	-1241.9	0.9970	270.19	0.841 µg.L ⁻¹	6.324 ^b µg.kg ⁻¹	2.802 µg.L ⁻¹	21.116 ^b µg.kg ⁻¹
	2	965.47	-1153.1	0.9971					
	3	964.20	-819.54	0.9967					
	4	963.85	-512.49	0.9949					
	5	959.46	-812.15	0.9958					
	6	965.92	-752.86	0.9940					

^a Estimado considerando uma recuperação média de tilosina de 99,6% e um fator de concentração de 8.

^b Estimado considerando uma recuperação média de tilosina de 94,0% e um fator de concentração de 8.

Modelo da curva de calibração: $y=ax+b$

Tabela 6.3S. Precisão intermediária da quantificação de tilosina em cama de aviário pelos métodos HPLC-UV e HPLC-MS / MS.

Réplicas	Método HPLC-UV (60 mg L ⁻¹)						Método HPLC-MS/MS (60 µg L ⁻¹)					
	Analista 1 – Dia 1		Analista 2 – Dia 2		Analista 3 – Dia 3		Analista 1 – Dia 1		Analista 2 – Dia 2		Analista 3 – Dia 3	
	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)
1	285168	2.120	289434	1.846	288434	2,020	55950	5.531	56847	5.969	50774	5.638
2	285191	2.129	289519	1.841	287517	2,009	56547	5.531	59501	5.619	49883	5.647
3	283247	2.127	289596	1.837	290596	2,017	55907	5.506	57945	5.619	53881	5.644
4	282860	2.126	289364	1.836	288860	1,996	58165	5.514	57807	5.618	54147	5.635
5	282714	2.124	289015	1.835	289714	2,004	56472	5.506	55053	5.618	52293	5.650
6	283545	2.118	289013	1.833	285545	2,018	56376	5.517	57783	5.606	53329	5.635
Média	283788	2,124	289323	1.838	288444	2.011	56569.5	5.518	57489.3	5.675	52384.5	5.642
SD	1117.07	0.004	252.15	0.005	1770.91	0.009	826.53	0.011	1469.01	0.144	1737.68	0.006
CV (%)	0.394	0.200	0.087	0.258	0.614	0.468	1.461	0.205	2.555	2.541	3.317	0.114

Tabela 6.4S. Resultados do estudo da robustez para a quantificação de tilosina em cama de aviário pelo método HPLC-UV.

Réplicas	Método Original		Variação: Comprimento de onda				Variação: Fluxo de fase móvel			
	(280 nm / 1.0 mL min ⁻¹)		278 nm		282 nm		0.9 mL min ⁻¹		1.1 mL min ⁻¹	
	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT
1	311156	1.536	308452	1.574	319014	1.575	347701	1.701	283423	1.417
2	311016	1.539	308189	1.565	319004	1.566	347626	1.699	283441	1.418
3	311175	1.545	307853	1.559	318429	1.560	347165	1.698	282600	1.422
4	311262	1.551	308401	1.552	318438	1.555	347620	1.696	282940	1.430
5	310927	1.549	308295	1.549	318988	1.550	348106	1.694	282359	1.436
6	312141	1.547	307679	1.547	318173	1.548	346657	1.696	283693	1.440
Média	311280	1.545	308144	1.558	318674	1.559	347479	1.697	283076	1.427
SD	438.71	0.006	311.97	0.010	371.43	0.010	501.63	0.003	527.92	0.009
CV (%)	0.141	0.379	0.101	0.669	0.117	0.657	0.144	0.1147	0.186	0.676

Tabela 6.5S. Resultados do estudo de robustez para a quantificação de tilosina em cama de aviário no método HPLC-MS/MS.

Réplicas	Método Original		Variação: Fluxo de fase móvel				Variação: Temperatura do Heat Block			
	(0.20 mL min ⁻¹ / 400 °C)		0.18 mL min ⁻¹		0.22 mL min ⁻¹		390 °C		410 °C	
	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT
1	74562	5.537	82290	6.110	79866	5.017	80216	5.525	82071	5.536
2	77637	5.566	82330	6.122	79379	5.008	77600	5.556	80997	5.538
3	75190	5.558	81535	6.137	83151	4.990	77652	5.550	82147	5.550
4	74551	5.526	82412	6.141	79712	5.004	77352	5.512	81126	5.527
5	76164	5.528	82595	6.125	81132	4.980	77440	5.521	80779	5.525
6	79542	5.541	82228	6.168	79479	5.007	76366	5.529	82151	5.521
Média	76274	5.543	82232	6.134	80453	5.001	77771	5.532	81545	5.533
SD	1981.1	0.016	364.1	0.020	1465.3	0.013	1286.9	0.017	643.3	0.011
CV (%)	2.597	0.292	0.443	0.327	1.821	0.270	1.655	0.311	0.789	0.192

7. TILOSINA EM REATORES ANAERÓBIOS: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO, EFEITOS NA PRODUÇÃO DE METANO E NA COMUNIDADE MICROBIANA

Resumo: Resíduos de tilosina presentes em dejetos animais, eliminados durante o tratamento terapêutico, podem ser reduzidos em sistemas anaeróbios. O presente estudo investigou a influência da concentração de tilosina em sistemas anaeróbios, além de avaliar a cinética de degradação e os microrganismos envolvidos em cada etapa da digestão anaeróbia (hidrólise/acidogênese; acetogênese; metanogênese). Os resultados mostraram um efeito estimulante na produção de metano com o aumento da concentração de tilosina, culminando em 80 mg kg⁻¹ de tilosina (232,89 NL CH₄. kgSV⁻¹). Quanto à degradação de tilosina, observou-se maiores remoções do antibiótico na fase metanogênica (88%), seguido pela acetogênica (84%) e hidrolítica/acidogênica (76%). Isso pode estar atribuído à maior taxa de degradação de tilosina obtida na etapa metanogênica, a qual está relacionada, principalmente, ao efeito co-metabólico exercido pela adição do acetato. A análise metagenômica sugere que a atuação sintrófica entre as arqueias do gênero *Methanobacterium*, e bactérias, como *Clostridium* e *Flexilinea*, contribuíram para a co-degradação da tilosina nesta etapa.

Palavras-chave: Antibiótico veterinário; cinética de degradação; metanogênese, acetogênese, metagenômica.

7.1. Introdução

Segundo dados da Organização para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2018, a produção mundial de proteína animal atingiu 553 milhões de toneladas, incluindo aves, suínos, bovinos, peixes, entre outros, dos quais China, União Europeia, Estados Unidos e Brasil lideraram o ranking de produção e exportação de carne. A fim de garantir essa produtividade, uma série de medidas são adotadas nas granjas de confinamento de animais, incluindo o uso de antimicrobianos. Essas substâncias podem ser usadas para fins terapêuticos, controle e prevenção de doenças, bem como para promover o crescimento (Kemper, 2008; Pereira et al., 2021).

O cenário atual de consumo de proteína animal aliado à problemática da resistência a antibióticos, tem alertado os órgãos mundiais de saúde. Segundo levantamento da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), em 2015, o consumo mundial de antibióticos veterinários foi de 104.779 toneladas, liderado pela Ásia e Oceania, seguidos por países americanos, europeus e africanos. Além disso, o relatório indica que, entre 2015 e 2017, as tetraciclina, penicilinas

(beta-lactâmicos), macrolídeos e sulfonamidas foram os antibióticos mais usados para reprodução de animais no mundo. Apesar da proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento em cerca de 70% dos países (OIE 2018), pode-se constatar que essas substâncias tem causado efeitos no meio ambiente, como a disseminação de resistência, que tem sido observada em diversos estudos (Pereira et al., 2021).

Dentre a classe dos macrolídeos, a tilosina - formada por um anel lactona de 16 membros com diferentes tipos de desoxi hexoses ligadas glicosidicamente, como a micinose, micaminose e micarose (Hansen et al., 2002) - é o antibiótico mais extensivamente utilizado por tratar pneumonias, infecções e até prevenir a micoplasmose em vários animais, como galinhas, perus, porcos e bezerros (Costa et al., 2013; Paranhos et al., 2020b). Isso vai ao encontro da projeção do Coherent Market Insights (www.coherentmarketinsights.com), no qual o mercado global de tilosina foi avaliado em US\$ 379,0 milhões em 2017 e é projetado para exibir um aumento de 1,2% durante o período de previsão (2018–2026). Entretanto, apesar das estimativas, alguns países têm proibido a utilização de tilosina como promotor de crescimento em animais confinados, como é o caso do Brasil, que por meio da Instrução Normativa MAPA nº 1, de 13 de Janeiro de 2020, proibiu o uso de tilosina, lincomicina e tiamulina, como aditivo melhorador de desempenho em animais (BRASIL, 2020). Ainda assim, segundo o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária (PAN-BR AGRO), o uso desses antimicrobianos para o tratamento de doenças, ainda é permitido (BRASIL, 2020).

Uma vez disseminados no ambiente, após o tratamento do animal, resíduos de antibióticos se tornam uma fonte dominante e perigosa de poluição (Zhi & Zhang, 2019). Diversas pesquisas foram conduzidas no sentido de degradar resíduos de antibióticos, incluindo a tilosina, utilizando por exemplo, técnicas como a fotodegradação (Voigt & Jaeger, 2017), hidrólise (Mitchell et al., 2015), digestão aeróbia (Kolz et al., 2005) e anaeróbia (Kolz et al., 2005; Zhi & Zhang, 2019).

A digestão anaeróbia é um método consolidado quanto à estabilização da matéria orgânica e simultaneamente, produção de energia renovável na forma de biogás. Normalmente, a digestão anaeróbia é operada com baixo teor de sólidos ($TS < 15\%$). Comparativamente com a digestão anaeróbia em fase líquida, a digestão anaeróbia fase sólida (SS-AD, $TS \geq 15\%$) possui várias vantagens, como diminuição do volume do reator, menor consumo de energia para aquecimento, e amostragem centralizada do material (Zhang et al., 2015; Paranhos et al., 2020a).

Diversos estudos têm sido conduzidos com o intuito de investigar o efeito que resíduos de antibióticos causam no processo de digestão anaeróbia e, particularmente, na produção de metano. A grande maioria deles reporta inibição da produção de metano em sistemas com a presença de antibióticos, como o estudo de Álvares et al. (2010), que demonstrou que a produção de biogás foi reduzida em 56%, 60% e 62% sob concentrações de oxitetraciclina de 10, 50 e 100 mg.L⁻¹, respectivamente. Outros estudos, por outro lado, mostraram que a presença de antibióticos em sistemas anaeróbios não afetou a produção de metano, como o trabalho de Zhi e Zhang (2019), que constataram que na concentração de 10 mg.L⁻¹ nenhum dos antibióticos testados (OTC, SDM, SMX, ENR, CIP, OFL e NOR) geraram efeitos na produção de metano em sistema tratando resíduos da suinocultura. Por sua vez, alguns estudos, mostraram ainda que a presença de antibióticos, em determinadas concentrações, gerou um efeito estimulante na produção de biogás. Como exemplo, Lu et al. (2014) verificaram que a presença de cefalexina nas concentrações de 600 e 1000 mg.L⁻¹ aumentou a produção de biogás.

Para antibióticos da classe dos macrolídeos, como tilosina e eritromicina, Massé et al. (2004) e Poels, Van Assche & Verstraete (1984) indicaram que a presença desses fármacos em sistemas anaeróbios não causaram nenhum efeito sobre a produção de biogás a partir de dejetos suínos. Contudo deve-se ressaltar, o emprego de elevados tempos de detenção hidráulica nesses trabalhos, 20 semanas (Massé et al., 2004) e 1 ano (Poels, Van Assche & Verstraete, 1984).

Pelo fato de a tilosina ser extensivamente utilizada como antibiótico em aves, estudos avaliando a sua cinética de degradação em sistemas anaeróbios tratando resíduo aviário, cujo teor de sólidos é alto, ainda são necessários.

Nesse sentido, o presente trabalho visou avaliar a influência da presença de tilosina (10 a 120 mg.kg⁻¹) na produção de metano, em reatores anaeróbios SS-AD (TS=15%) tratando esterco de aves e palha de arroz. Além disso, investigaram-se a cinética de degradação anaeróbia da tilosina e os microrganismos envolvidos nas principais etapas da digestão anaeróbia (hidrolítica/acidogênica; acetogênica e metanogênica).

7.2. Materiais e Métodos

7.2.1. *Materiais e Produtos Químicos*

A palha de arroz foi gentilmente cedida pela empresa Avivar Alimentos, localizada em São Sebastião do Oeste, Minas Gerais, Brasil. A excreta de aves utilizada no estudo veio de galinhas poedeiras domésticas, alimentadas com milho moído e ração sem suplementação de antibióticos veterinários. O inóculo para os testes de BMP foi preparado da mesma forma

descrita por Paranhos et al. (2020) (ver capítulo 5), utilizando lodo de reator UASB alimentado com esgoto doméstico, coletado na ETE Marzagão, localizada em Itabirito, Minas Gerais, Brasil.

Mistura equimolar de grau analítico contendo metano, hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio foi obtida da São Carlos Gases Ltda (Brasil). Ácido sulfúrico (95 – 98% e 99.999%) foi adquirido pela Synth (Brasil) e Sigma-Aldrich (Brasil). Clorofórmio foi adquirido pela Synth (Brasil) e acetonitrila (grau HPLC) foi obtido pela J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Padrões cromatográficos de celobiose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido capróico, 5-hidróximetilfurfural (HMF) e furfuraldeído (FF) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). Tartarato de tilosina (padrão analítico) foi obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) e Tylan 200 (tilosina comercial injetável 200 g.L⁻¹) foi obtida da Elanco (Brasil).

7.2.2. Experimentos em batelada com diferentes doses de tilosina

Experimentos de co-digestão anaeróbia em fase sólida (SS-AD) de esterco de aves e palha de arroz (5:1 m.m⁻¹) foram realizados em frascos de vidro de 120 mL (reatores em batelada), no qual 50% do volume foi destinado ao *headspace* e o restante ao volume útil. Os frascos foram igualmente preenchidos com o substrato e inóculo de forma a manter a relação alimento/microrganismo (A/M) de 0,5 gSV. gSV⁻¹ (0,77 gDQO. gSV⁻¹) e teor de sólidos totais (ST) de 15%, conforme determinado pelo Capítulo 5. Além disso, tilosina comercial (Tylan 200) foi acrescentada aos frascos de forma a alcançar os teores de 0, 10, 20, 30, 50, 80, 100 e 120 mg.kg⁻¹, intervalo tipicamente reportado na literatura. Para cada condição, os experimentos foram conduzidos em duplicata, acrescidos do frasco-controle (ausência de substrato) para a verificação da produção endógena de metano pelo inóculo. O pH foi acertado em aproximadamente 9,0 utilizando NaOH (1,0 mol.L⁻¹) e gás N₂ foi purgado de forma a manter a anaerobiose do sistema. Os frascos foram incubados em incubadora shaker (Thoth, modelo 6440) e mantidos a temperatura e agitação constantes (35°C e 180 rpm).

A quantificação de biogás produzido durante a SS-AD foi monitorada a cada 12h nos primeiros 20 dias e a cada 24h daí em diante, até a estabilização da produção, registrando-se a pressão acumulada nos frascos (Manômetro, modelo PM-9100HA). A composição do biogás, em termos de metano (% v.v⁻¹), foi determinada por cromatografia de fase gasosa, em cromatógrafo (Shimadzu, modelo GC 2014) equipado com um detector de condutividade térmica, nas condições descritas por Lima et al. (2018). Todos os experimentos foram

monitorados por 60 dias e todos os valores de produção de metano foram expressos em $\text{NLCH}_4.\text{kgSV}^{-1}$, considerando as condições padrão de temperatura e pressão (273,15 K e 101,315 Pa) conforme recomendado pela União Internacional de Química Pura Aplicada (IUPAC).

7.2.3. *Remoção de tilosina em sistemas anaeróbios*

Para avaliar a contribuição de cada etapa (acidogênese, acetogênese e metanogênese) da digestão anaeróbia na remoção de tilosina, três conjuntos de experimentos foram programados e executados. O primeiro *set* utilizou celobiose (20 g.L^{-1}) como substrato e clorofórmio ($0,05\% \text{ v.v}^{-1}$) como agente inibidor das arqueias metanogênicas (Conrad & Klose, 2000), e objetivou avaliar a remoção de tilosina sob condições predominantemente acidogênicas. O segundo *set* utilizou uma mistura de ácidos isobutírico (10 g.L^{-1}) e isovalérico (10 g.L^{-1}) e clorofórmio ($0,05\% \text{ v.v}^{-1}$), de forma a avaliar a contribuição acetogênica na remoção de tilosina. Por fim, o terceiro *set* utilizou ácido acético (5 g.L^{-1}) como substrato na ausência do inibidor da metanogênese (clorofórmio), para avaliar a remoção de tilosina na condição de favorecimento da metanogênese, principalmente acetoclástica.

Em cada um dos três conjuntos experimentais, 15 frascos (em duplicata) eram preparados de forma semelhante ao item 2.2, com acréscimo do inóculo e substrato, na razão $A/M = 0,77 \text{ gDQO. gSV}^{-1}$ como determinada no capítulo 6, e solução de tilosina (Tylan 200) na concentração aproximada de 200 mg.L^{-1} , isto é, concentração 1000 vezes maior que a concentração média encontrada na cama de aviário (Paranhos et al., 2020b – capítulo 5). O pH foi ajustado em aproximadamente 7,5 utilizando NaOH (1,0 M) e gás N_2 foi purgado de forma a manter a anaerobiose do sistema. Frascos-controle contendo apenas inóculo ou contendo substrato e inóculo (ausência de tilosina) também foram preparados. Todos frascos foram incubados simultaneamente em incubadora shaker (Thoth, modelo 6440) e mantidos a temperatura e agitação constantes (35°C e 180 rpm).

Cada um dos 15 frascos foi amostrado após completados os seguintes tempos: 0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 30h, 48h, 72h, 96h, 144h, 192h, 240h e 288h. Antes da abertura do frasco, o biogás gerado era quantificado e analisado para que em seguida, o seu conteúdo fosse amostrado para aferição do pH, concentração de AGVs e tilosina residual na fase líquida.

7.2.4. *Modelagem cinética dos dados experimentais*

O modelo de Gompertz modificado é um modelo empírico que permite a determinação de parâmetros importantes da digestão anaeróbia como o tempo de fase lag, taxa de produção específica de metano e produção máxima acumulada de metano (Zwietering et al., 1990). Nesse

trabalho, o modelo de Gompertz modificado, descrito pela Eq. (7.1), foi utilizado para modelar os resultados obtidos a partir dos experimentos de BMP.

$$P = P_0 \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m e}{P_0} (\lambda - 1) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. (7.1)}$$

Em que ‘P’ é o potencial de produção acumulado de metano (NL CH₄. kgSV⁻¹), ‘P₀’ é o potencial máximo de metano (NL CH₄. kgSV⁻¹), ‘μ_m’ é a taxa de produção máxima de metano (NL CH₄. kgSV⁻¹dia⁻¹), ‘λ’ é o tempo de fase lag (dias) e ‘e’ é o número de Euler.

Os dados de remoção da tilosina nas etapas de acidogênese, acetogênese e metanogênese foram ajustados de acordo com os modelos cinéticos de primeira ordem e primeira ordem ajustado. O modelo de primeira ordem é descrito de acordo com a Eq. (7.2), que depois de integrada resultou na Eq. (7.3). Usando esse modelo, o tempo de meia-vida de degradação é calculado de acordo com a Eq. (4).

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad \text{Eq. (7.2)}$$

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad \text{Eq. (7.3)}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Eq. (7.4)}$$

Em que ‘C₀’ é a concentração inicial de tilosina (mg kg⁻¹), ‘C_t’ é a concentração de tilosina (mg kg⁻¹) no tempo ‘t’ (adotado aqui neste trabalho em horas) e ‘k’ é a constante da taxa de degradação do antibiótico (h⁻¹).

O modelo de primeira ordem ajustado leva em consideração a possibilidade de diminuição da disponibilidade do substrato (tilosina) no meio devido à sua sorção em partículas suspensas. Dessa forma, o modelo pode ser descrito conforme a Eq. (7.5) (Wang et al., 2006).

$$\frac{dC}{dt} = -k\lambda C \quad \text{Eq. (7.5)}$$

Em que ‘λ’ é definido como a razão de concentração do antibiótico não adsorvido em relação a concentração de antibiótico total restante no sistema no tempo ‘t’. Supõe-se que ‘λ’ é uma função de ‘t’ e pode ser expressa como:

$$\lambda = \lambda_0 e^{-at} \quad \text{Eq. (7.6)}$$

Em que ‘ a ’ é uma constante positiva chamada coeficiente de disponibilidade e ‘ λ_0 ’ é a razão da quantidade não adsorvida em relação à quantidade total de antibiótico em $t=0$.

A substituição da Eq. (7.6) na Eq. (7.5) gera a Eq. (7.7), que depois de integrada resulta na Eq. (7.8).

$$\frac{dC}{dt} = -k''C e^{-at} \quad \text{Eq. (7.7)}$$

$$C_t = C_0 e^{\left(\frac{-k''}{a}(1-e^{-at})\right)} \quad \text{Eq. (7.8)}$$

Em que ‘ k'' ’ é definida como constante da taxa de degradação (igual a $k.\lambda_0$), ‘ C_0 ’ é a concentração inicial de tilosina (mg kg^{-1}), ‘ C_t ’ é a concentração de tilosina (mg kg^{-1}) no tempo ‘ t ’ (h) e ‘ a ’ é a constante de disponibilidade, a qual foi estimada pelo modelo a partir de interação.

Para o modelo cinético de primeira ordem ajustado, o tempo de meia-vida é calculado conforme a Eq. (7.9) descrita a seguir:

$$t_{1/2} = -\frac{1}{a} \ln \left(1 - \frac{(\ln 2)a}{k''} \right) \quad \text{Eq. (7.9)}$$

A estimativa dos parâmetros (k , k'' , a) dos modelos cinéticos avaliados foi realizada pelo método do Gradiente Reduzido Generalizado (GRG), que está implementada na ferramenta Solver do Microsoft Office Excel 2019. A seleção do modelo que melhor descreve a biodegradação da tilosina foi realizada por meio das seguintes funções de erro: coeficiente de determinação (R^2), erro quadrático médio (RMSE), erro quadrático médio normalizado (NRMSE) e Critério de Informação de Akaike (AIC) (Lima et al., 2018).

7.2.5. Caracterização metagenômica da comunidade presente nos sistemas anaeróbios

As amostras referentes aos tempos 0h, 96h e 288h de cada conjunto de experimentos visando avaliar a cinética de degradação de tilosina, foram selecionadas para caracterização metagenômica. Inicialmente, essas amostras foram centrifugadas a 4.500 rpm durante 10 min. O sobrenadante formado foi então descartado e o pellet foi reservado a -20 °C, até o momento da análise. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento pela tecnologia Illumina na empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis,

Brasil). Os procedimentos de extração de DNA e *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foram realizados conforme a metodologia descrita por Christoff et al. (2017).

Para se obter os produtos de PCR, foram utilizadas duas estratégias. Na primeira PCR, feita em triplicata, foram utilizados os *primers* 341F e 806R, que correspondem à região V3-V4, cobrindo ambos os domínios Bacteria e Archaea (Wang e Qian, 2009; Caporaso et al. 2011). Estes *primers* continham sequências Illumina baseadas no adaptador de estrutura TruSeq (Illumina, San Diego, CA), permitindo que a segunda PCR contivesse sequências de indexação. Nos dois tipos de PCR, foi utilizada a enzima Platinum Taq (Invitrogen, EUA). Na primeira reação, foram utilizadas as seguintes condições: 95 °C por 5 min na etapa de desnaturação; 25 ciclos de 95 °C (45s), 55 °C (30s) e 72 °C (45s) na etapa de anelamento; 72 °C (2 min) na etapa de extensão final. Na segunda reação foram utilizados: 95 °C (5 min) na etapa de desnaturação; 10 ciclos de 95 °C (45s), 66 °C (30s) e 72 °C (45s) para o anelamento e 72 °C (2 min) para a extensão final.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados (esferas AMPureXP - Beckman Coulter, Brea, CA) e adicionados à biblioteca de sequenciamento. As bibliotecas agrupadas foram diluídas e quantificadas usando o KAPA Library Quantification Kit para plataformas Illumina (KAPA Biosystems, Woburn, MA). Em seguida, os produtos de PCR foram sequenciados em um sistema MiSeq, usando os *primers* padrão Illumina fornecidos em kit específico.

Após o sequenciamento, as leituras foram normalizadas para o tamanho 283 bp (pares de base). Foi utilizado um filtro de qualidade de leitura, convertendo cada pontuação de nucleotídeo em uma probabilidade de erro, levando em consideração o comprimento da leitura. Se este valor fosse menor ou igual a 0,01 (1%), a leitura era considerada na análise. Para aumentar a confiabilidade da leitura, leituras 100% idênticas foram agrupadas. Além disso, se algum grupo foi representado por menos de 5 leituras, este não foi considerado nas análises seguintes.

As unidades taxonômicas operacionais (*Operational Taxonomic Units* – OTUs) foram submetidas à classificação taxonômica e comparadas à base de dados referente ao RNAr 16S (NeoRefdb, Neoprosecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brasil). Sequências que apresentaram mais de 99% de similaridade com a base de dados de referência, foram taxonomicamente atribuídas.

7.2.6. Procedimentos analíticos

As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Totais (ST) e Voláteis (SV) foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and*

Wastewater (APHA, 2005). Após a estabilização da produção de metano e/ou após a abertura dos frascos no tempo determinado para a avaliação cinética, uma parte do conteúdo dos reatores era aliqüotada para a extração de tilosina, e outra parte era centrifugada (Microcentrífuga Herolab 14800 rpm), filtrada em membrana de acetato de celulose (Sartorius – 0,45 μm) e diluída 5 vezes para a análise de açúcares e AGVs.

A concentração dos açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e ácidos orgânicos (succínico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caprótico) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, com um HPLC Shimadzu, equipado com coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm – BIO-RAD) mantida a 55°C (Shimadzu, model CTO-30A), detector de índice de refração (Shimadzu, model RID-6A) para açúcares, e detector por arranjo de diodos (Shimadzu, model SPD-M20A) para ácidos orgânicos (210 nm). Ácido sulfúrico (5 mmol.L^{-1}) foi usado como eluente sob vazão de 0,6 mL.min^{-1} .

O método de detecção de tilosina foi modificado a partir de Paranhos et al. (2020b) (capítulo 6). Para a extração, amostras de 1,0 g do conteúdo dos reatores em batelada (contendo inóculo, substrato e tilosina) foram adequadamente pesadas (Balança Shimadzu AUX220) em frascos âmbar de 12 mL, juntamente com a adição de 0,8 g de NaCl PA. Os frascos foram vigorosamente agitados em vórtex (Warmnest) à 2800 rpm por 1 min para homogeneização da amostra. 8,0 mL de acetonitrila foi adicionada e agitada a 2800 rpm por mais 5 min. As amostras foram mantidas em freezer (-20°C) por um período maior que 16h (overnight). Posteriormente, alíquota de 2,0 mL do sobrenadante foi removido e centrifugado (Centrífuga Eppendorf) a 5400 rpm por 10 min. Após esse período, 1,0 mL do sobrenadante foi aliqüotado e armazenado em *vials* para análise. A análise de tilosina ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 916,40 \text{ m/z}$) foi realizada em LCMS-8040 do tipo triplo quadrupolo (Shimadzu-Kyoto, Japan) equipado com fonte de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI +), e coluna Poroshell 120 EC-C18 (4 μm , 100 x 4.6 mm) sob um fluxo de 0,2 mL.min^{-1} . Todas as demais configurações estão descritas no capítulo 6 e os parâmetros obtidos para a revalidação do método analítico estão apresentados na Tabela 7.1S, no Anexo (item 7.6).

7.3. Resultados e Discussão

7.3.1. Efeito da adição de tilosina em reatores anaeróbios

A Figura 7.1 mostra o efeito da tilosina, em diferentes concentrações, na produção acumulada de metano. Na concentração de 10 mg.kg^{-1} , a tilosina não demonstrou grandes efeitos na produção acumulada de metano, exceto por um ligeiro aumento (111,23 NL CH_4 .

kgSV⁻¹) quando comparado com o branco (108,78 NL CH₄. kgSV⁻¹). Resultados semelhantes já foram apontados por alguns autores, como Zhi et al. (2017) que indicaram que a tetraciclina nas concentrações dentre 0 – 12 mg.L⁻¹ não gerou efeitos relevantes no rendimento de CH₄ em sistema com alto teor de sólidos e Zhi & Zhang (2019) que verificaram que a concentração de 10 mg.L⁻¹ não influenciou a produção de metano para nenhum dos antibióticos testados (OTC, SDM, SMX, ENR, CIP, OFL e NOR) em sistemas tratando efluente de suinocultura. De forma similar, Poels, Van Assche & Verstraete (1984) mostraram que a adição de 1,7, 8,3 e 16,7 mg.L⁻¹ de tilosina, também em sistemas tratando efluente de suinocultura, não gerou efeitos na produção de metano. Massé et al. (2004) também mostraram que a produção de metano não teve nenhum efeito com a adição de tilosina e sulfametazina até 110 mg.kg⁻¹.

Assim como reportado por Zhi & Zhang (2019) (TS = 20%), a digestão anaeróbia em fase sólida com 15% TS utilizada nesse trabalho, propicia maior quantidade de biomassa e, conseqüentemente, maior resistência à carga de antibiótico aplicada do que a digestão anaeróbia em fase líquida. Soma-se a isso, a utilização de inóculo composto por uma mistura de esterco de aves e lodo de UASB alimentado com esgoto sanitário (Paranhos et al., 2020a – capítulo 5), que resultou em maior adaptabilidade da microbiota e maior atividade metanogênica.

A partir da concentração de 20 mg.kg⁻¹ de tilosina, observou-se significativos aumentos na produção acumulada de metano, no qual a produção máxima (232,89 NL CH₄. kgSV⁻¹) foi atingida com a adição de 80 mg.kg⁻¹ de tilosina. Esse efeito estimulante da adição de antibióticos em sistemas anaeróbios foi outrora verificado por Lu et al. (2014), que indicaram que a adição de 600 e 1000 mg.L⁻¹ de cefalexina aumentou a produção de metano; e por Zhi & Zhang (2019) que reportaram que a adição de 100 mg.L⁻¹ de diferentes antibióticos (OTC, SDM, SMX, ENR, CIP, OFL e NOR) aumentou a produção de CH₄ em sistemas tratando efluente de suinocultura.

A Figura 7.1 mostra que a partir da concentração de 100 mg.kg⁻¹, observa-se um decréscimo na produção acumulada de metano, quando comparada com a produção máxima obtida com 80 mg.kg⁻¹ tilosina. Alguns autores reportaram resultados semelhantes. Por exemplo, Álvarez et al. (2010) mostraram que 100 mg.L⁻¹ de OTC e CTC diminuiu a produção de metano em 64,1% num sistema anaeróbio com esterco suíno. Sanz et al. (1996) mostraram que a produção de metano foi reduzida de 80% para 20% quando a concentração de CTC aumentou de 2 para 150 mg.L⁻¹. Entretanto, nas concentrações avaliadas nesse estudo, não observou-se inibição da produção de metano, em relação ao frasco controle (sem antibiótico), com a adição de tilosina em diferentes concentrações.

Com base na análise descrita, resíduos de tilosina em diferentes concentrações possuem diferentes efeitos no rendimento de metano em SS-AD tratando esterco de aves. Em concentrações relativamente baixas, a tilosina não gera nenhum efeito na produção de metano, o que pode ser considerado um fenômeno comum em aplicações práticas, visto a baixa concentração de tilosina ($135 - 265 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) encontrada em camas de aviário (Paranhos et al., 2020b – capítulo 6). Por outro lado, sob condições extremas, como durante o tratamento terapêutico em que são aplicadas de 5 a 55 mg tilosina por kg de peso vivo do frango (<https://www.elanco.com.br/produtos/aves/tylan>), a concentração do antibiótico pode estimular ou inibir a produção de metano em sistema SS-AD.

O modelo de Gompertz modificado é um modelo cinético extensivamente utilizado para prever a produção de metano em processos anaeróbios (Donoso-Bravo et al., 2010). Esse modelo adiciona dois parâmetros, μm ($\text{NmL}\cdot\text{gSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) e λ (d), os quais indicam a taxa de produção máxima de metano e a duração da fase de adaptação da biomassa (fase lag), respectivamente. Tal modelo é apropriado para sistemas SS-AD que, geralmente, possuem diferentes fases lag, especialmente sob influência de resíduos de antibióticos.

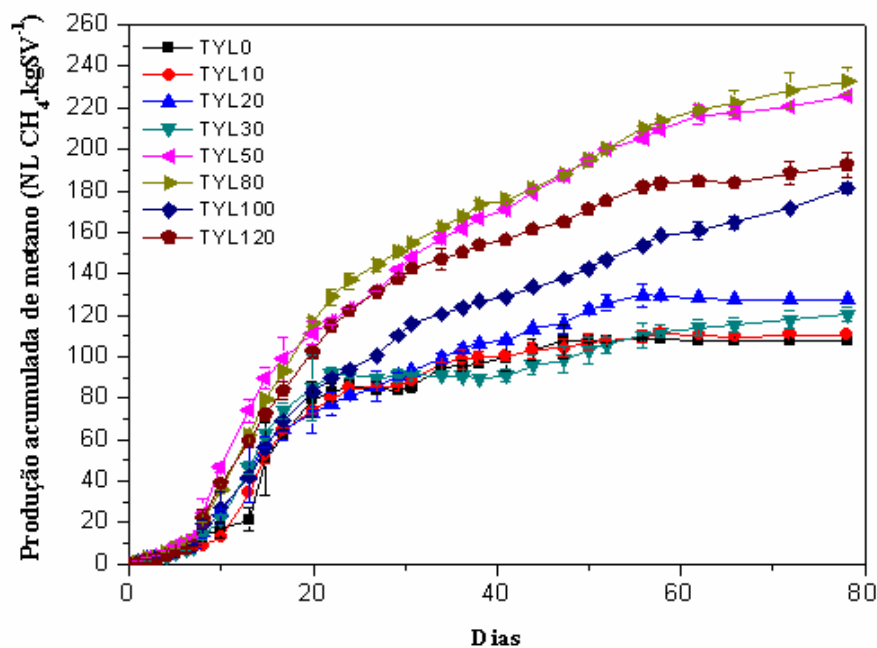


Figura 7.1: Produção acumulada de metano sob diferentes doses de tilosina.

A Tabela 7.1 mostra os parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtido a partir da produção acumulada de metano nos ensaios de batelada sob diferentes doses de tilosina. Os valores apresentados na tabela indicam que o modelo possui bom ajuste aos dados

experimentais, face os elevados valores de R^2 obtidos (0,9852 a 0,9959). A mais elevada taxa de produção máxima de metano ($\mu_m = 6,63 \text{ mL.gVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi obtida no ensaio em que se observou a mais elevada produção de metano acumulada ($232,89 \text{ NL CH}_4. \text{ kgVS}^{-1}$), sugerindo que a adição de 80 mg.kg^{-1} de tilosina ao reator estimulou a atividade metanogênica.

Em relação à fase lag (λ), observou-se uma diminuição no tempo de fase lag a partir da biomassa com a adição de 50 mg.kg^{-1} tilosina, indicando que nas mais altas concentrações de tilosina testadas, a produção de metano é iniciada mais rapidamente. Além disso, os rendimentos de metano previsto e medido no dia 80 foram similares, o que confirma a aplicabilidade e acurácia do modelo de Gompertz modificado para esse estudo.

Ácidos Graxos Voláteis (AGVs) são produtos intermediários da digestão anaeróbia, e podem servir como indicativos do desempenho de sistemas anaeróbios quanto à produção de metano. A Figura 2 mostra o total de AGVs acumulados nos biorreatores em batelada após 80 dias de SS-AD sob diferentes doses de tilosina. É possível observar uma leve inclinação positiva na concentração de AGVs totais com o aumento da concentração de tilosina, que culminam em $3066,1 \text{ mg.L}^{-1}$ AGVs no reator que recebeu 100 mg.kg^{-1} tilosina. Contudo, o acúmulo de AGVs decresceu no reator alimentado com 120 mg.kg^{-1} de tilosina.

O acúmulo de AGVs em sistemas anaeróbios reflete inibições de ordem cinética ou termodinâmica causadas pelo excesso de substratos facilmente biodegradados ou presença de compostos tóxicos (Aquino & Chernicharo, 2005). De fato, muitas pesquisas mostraram que resíduos de antibióticos em reatores anaeróbios podem causar acúmulo de AGVs nesses sistemas. Por exemplo, Beneragama et al. (2013) reportaram que o acúmulo de AGVs resultou no decréscimo da produção de metano na presença de cefazolin e oxitetraciclina. Zhi & Zhang (2019) reportaram que na concentração de 500 mg.L^{-1} a maioria dos antibióticos testados gerou um efeito supressivo na produção de metano e resultou no acúmulo de AGVs. E ainda, Shimada et al. (2008) reportaram que a tilosina, na concentração de 167 mg.L^{-1} , inibiu a degradação de propionato no reator alimentado com glicose, gerando acúmulo de propionato e, em menor grau, de acetato.

Da mesma forma que observado para os AGVs, a concentração dos carboidratos também mostrou um perfil ascendente com o aumento da concentração de tilosina, exceto pelo reator que recebeu 100 mg.kg^{-1} tilosina (Figura 7.2). A tilosina é um macrolídeo formado por um anel lactona de 16 membros com diferentes tipos de desoxi hexoses ligadas glicosidicamente, como a micinose, micaminose e micarose, e a clivagem desses açúcares libera substratos para os microrganismos acidogênicos ao mesmo tempo que causa perda no efeito antibacteriano (Hansen et al., 2002; Voigt & Jaeger, 2017).

Tabela 7.1: Concentração residual de tilosina e parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir da produção acumulada de metano nos ensaios em batelada.

BMP ID	[Tilosina] _{inicial} (mg.kg ⁻¹)	[Tilosina] _{final} (µg.kg ⁻¹)	R ²	µ _m (mL.g VS ⁻¹ d ⁻¹)	λ (d ⁻¹)	CH ₄ acumulado (80 dias)		
						Predito – P (NL.kgVS ⁻¹)	Medido (NL.kgVS ⁻¹)	Medido (NL.kgDQO ⁻¹)
TYL0	-	-	0,9929	5,02 ± 0,33	5,67 ± 0,69	105,80	108,78 ± 0,68	70,63 ± 0,44
TYL10	8,31 ± 0,01	1,24 ± 0,38	0,9956	5,16 ± 0,28	5,92 ± 0,55	106,98	111,23 ± 2,29	72,41 ± 1,49
TYL20	20,70 ± 0,06	1,55 ± 0,02	0,9942	4,15 ± 0,21	5,75 ± 0,72	126,57	129,49 ± 5,29	84,09 ± 3,49
TYL30	33,00 ± 0,19	3,28 ± 1,08	0,9852	6,38 ± 0,69	5,69 ± 0,89	103,83	120,32 ± 3,36	78,09 ± 2,18
TYL50	53,67 ± 0,38	5,24 ± 0,51	0,9922	5,92 ± 0,32	3,20 ± 0,90	216,10	225,80 ± 0,10	146,32 ± 0,06
TYL80	78,15 ± 0,77	6,48 ± 1,07	0,9932	6,63 ± 0,36	4,47 ± 0,83	216,31	232,89 ± 6,63	151,10 ± 4,30
TYL100	103,29 ± 0,37	8,23 ± 2,08	0,9930	4,56 ± 0,24	4,14 ± 0,88	164,37	181,22 ± 2,59	117,69 ± 1,69
TYL120	126,86 ± 0,46	13,29 ± 2,86	0,9959	6,44 ± 0,29	4,76 ± 0,59	180,90	192,63 ± 6,03	125,34 ± 3,94

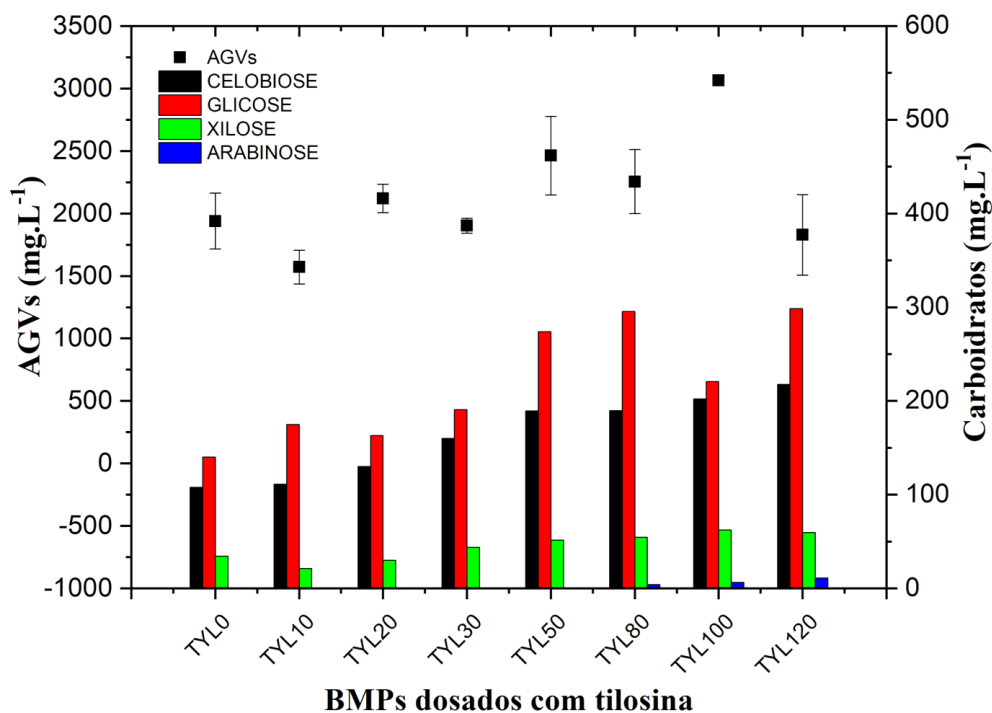


Figura 7.2: Perfil de carboidratos e ácidos graxos voláteis totais produzidos nos BMPs com diferentes dosagens de tilosina, ao final do experimento (64 dias).

Os resultados apresentados na Figura 7.2, juntamente com a elevada remoção de tilosina (> 99%) em todos os ensaios (Tabela 7.1), sugerem a ocorrência de clivagem do antibiótico, com liberação de desoxi hexoses, e a conversão dessas em açúcares mais simples (KEGG pathway – Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides – https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00522). O balanço de massa da fração líquida presente nos reatores, em termos de DQO, conforme apresentado na Tabela 7.2S do Anexo (item 7.6), confirma as transformações bioquímicas descritas, visto correspondência superior a 72%. Além disso, o efeito estimulante da tilosina promoveu um aumento da atividade microbiana hidrolítica, considerando também a detecção crescente de xilose e arabinose nos ensaios com maiores concentrações desse fármaco.

7.3.2. Cinética de remoção de tilosina em sistemas anaeróbios

A fim de avaliar a degradação da tilosina nas diferentes fases da digestão anaeróbia, três conjuntos experimentais foram realizados com o intuito de estimular os microrganismos responsáveis pela degradação da tilosina durante a hidrólise/acidogênese (fase 1), acetogênese (fase 2) e metanogênese (fase 3). Os resultados mostraram que a maior remoção de tilosina (87,72%) ocorreu no experimento na qual as arqueias metanogênicas não foram inibidas (fase 3) e utilizou-se acetato como substrato, quando comparado com os experimentos que visaram

selecionar microrganismos acetogênicos (84,90%) e hidrolíticos/acidogênicos (76,12%). De qualquer forma, percebe-se que pelo menos $\frac{3}{4}$ da tilosina adicionada é degradada em quaisquer das condições testadas.

A Figura 7.3 mostra o ajuste dos dados experimentais ao modelo cinético, bem como o desempenho dos reatores em batelada em termos da concentração de ácidos graxos voláteis, manutenção do pH e produção de H_2 ou CH_4 . Os resultados indicam que para a fase acetogênica (Figura 7.3b), o perfil de AGVs se manteve constante frente à concentração inicial (tempo zero), principalmente em relação aos ácidos isobutírico e isovalérico adicionados no início do teste. Ao contrário disso, nas outras fases (Figura 7.3a e 7.3c) é observado um aumento significativo na concentração de AGVs, como resultado da produção desses ácidos, principalmente de ácido acético, com a degradação de tilosina no decorrer do ensaio.

O pH, por sua vez, também assumiu comportamentos diferenciados em cada experimento. É possível observar a manutenção do pH - em torno da neutralidade - durante as fases acetogênica (Figura 7.3b) e metanogênica (Figura 7.3c). Porém, como era esperado, na fase correspondente à hidrólise/acidogênese, houve uma redução do pH e estabilidade em torno de 5, a partir de 72h de experimento (Figura 7.3a). Apesar de mais baixo que nas outras fases, não há relação direta entre a diminuição do pH na fase 1 e a degradação da tilosina nesses experimentos. Segundo Mitchell et al. (2015), entre os pHs 5 e 8, a hidrólise de macrolídeos é independente do pH, entretanto, em condições extremas, abaixo de 4 e acima de 9, a tilosina naturalmente se degrada com tempos de meia-vida de 1,1d e 3,5d, respectivamente.

Quanto à produção de biogás, os resultados mostraram que a adição de clorofórmio aos reatores das fases hidrolítica/acidogênica e acetogênica, com o intuito de inibir as arqueias metanogênicas – conforme indicado por Conrad & Klose (2000) - foi eficiente, uma vez que apenas H_2 foi produzido nessas fases. As fases mencionadas produziram, respectivamente, um acumulado de 7,06 e 0,25 NmL H_2 . gDQO⁻¹. Como esperado, os experimentos da fase metanogênica produziram metano ininterruptamente a partir de 24h de experimento até o final do experimento, totalizando um acumulado de 25,57 NmL CH_4 . gDQO⁻¹. Os balanços de massa ponto-a-ponto da fração líquida, em termos de DQO, confirmam os resultados experimentais obtidos em cada fase, e são mostrados nas Tabelas 7.3S – 7.5S do Anexo (item 7.6).

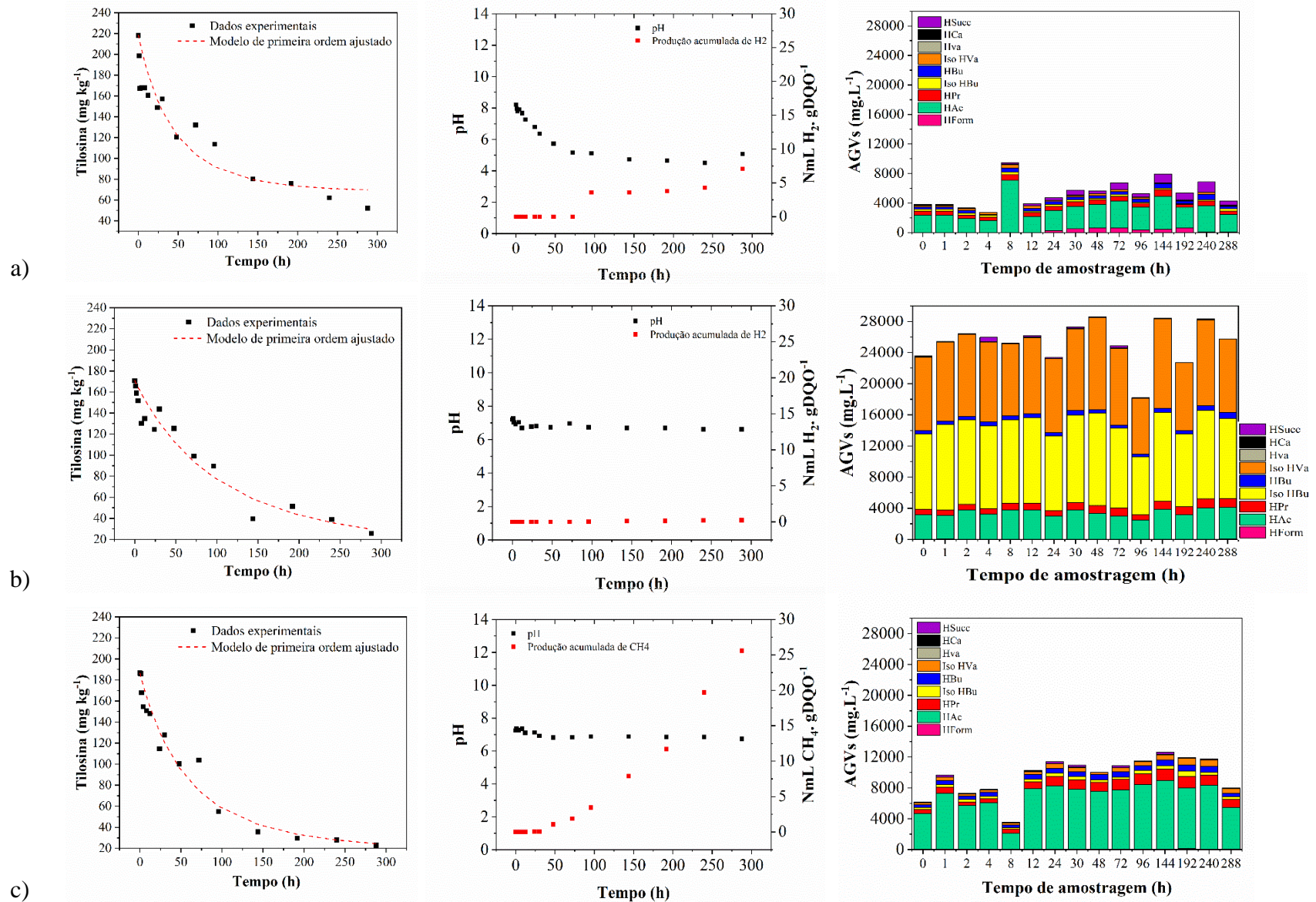


Figura 7.3: Modelo cinético de primeira ordem ajustado para a remoção de tilosina e desempenho dos reatores (manutenção do pH, produção de biogás e perfil de AGVs) nas fases de hidrólise/acidogênese(a), acetogênese (b) e metanogênese (c).

Os modelos cinéticos de primeira ordem e de primeira ordem ajustado foram avaliados quanto ao seu ajuste aos dados experimentais de remoção da tilosina nas fases de hidrólise/acidogênese, acetogênese e metanogênese. O modelo cinético de primeira ordem tem sido muito utilizado na literatura para descrever a biodegradação de compostos orgânicos (Li and Zhang, 2010; Wu et al., 2011). Além da tilosina (Angenent et al., 2008; Ma et al., 2015), o modelo já foi aplicado em sistemas biológicos para modelar a remoção de outros fármacos como sulfametoxazol (da Silva Rodrigues et al., 2020), clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina (Wu et al., 2011), sulfamonometoxina, sulfacloropiridazina, sulfametazina, trimetoprim, norfloxacina, ofloxacina, lincomicina, leucomicina e oxitetraciclina (Chen et al., 2017).

Os parâmetros cinéticos dos modelos avaliados, assim como os valores das funções de erro, são mostrados na Tabela 7.2. O modelo de primeira ordem ajustado descreveu melhor o comportamento de remoção da tilosina em todas as fases quando comparado ao modelo de primeira ordem, uma vez que apresentou maiores valores de R^2 (0.82; 0.93; 0.96) e menores valores de AIC (94.98; 80.39; 77.99), motivo pelo qual foi representado na Figura 7.3. De qualquer forma, o modelo de primeira ordem também se mostrou adequado para a descrição matemática da acetogênese e metanogênese, com valores de $R^2 > 0.92$.

A remoção de fármacos em processos biológicos pode ter influência de outros processos além da biodegradação, tais quais sorção, volatilização e transformações químicas (Suárez et al., 2008). O mecanismo de volatilização pode ser desconsiderado na remoção da tilosina, uma vez que tal antibiótico apresenta baixa constante de Henry ($5.77 \times 10^{-38} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ (25 °C)), baixa pressão de vapor ($1.98 \times 10^{-34} \text{ mm Hg}$ (25° C)) e alto peso molecular ($916.10 \text{ g mol}^{-1}$) (US NLM, 2021; Rogers, 1996).

O modelo de primeira ordem ajustado leva em consideração a potencial diminuição da disponibilidade do antibiótico no meio devido à sorção (Wu et al., 2011). Nesse modelo, a constante positiva ' a ' é denominada coeficiente de disponibilidade. Quanto maior o valor de ' a ', mais rapidamente o valor de ' λ ' (razão da concentração do antibiótico não adsorvido pela concentração restante total do antibiótico) diminui com o tempo durante o processo de biodegradação (Wang and Yates, 2008). Nessa perspectiva, pode-se inferir que a adsorção teve pouca contribuição na remoção da tilosina por digestão anaeróbia, visto que o valor de a foi inferior a 0.01 em todas as etapas. Isso está coerente com os resultados cinéticos que indicaram que o modelo de 1ª ordem clássico também se ajustou bem aos dados experimentais. Além disso, os dados apresentados estão de acordo com Angenent et al. (2008), que concluíram que

a biodegradação, em vez de sorção, foi o principal mecanismo para a remoção de tilosina nos sistemas anaeróbios em batelada e batelada sequencial estudados.

Tabela 7.2: Parâmetros obtidos a partir dos modelos cinéticos de primeira ordem e de primeira ordem ajustado para a remoção da tilosina nas três etapas da digestão anaeróbia (hidrólise, acetogênese e metanogênese).

Modelo	Parâmetros	Etapa		
		Hidrólise	Acetogênese	Metanogênese
Primeira ordem	k (h ⁻¹)	0.0072	0.0075	0.0116
	R ²	0.6579	0.9203	0.9341
	RMSE	28.1954	13.5586	14.7897
	NRMSE	16.9719	9.3520	9.0413
	AIC	104.1747	82.2105	84.8180
	t _{1/2} (h)	96.4686	92.3394	59.6657
Primeira ordem ajustado	k'' (h ⁻¹)	0.0165	0.0093	0.0161
	a	0.0143	0.0032	0.0068
	R ²	0.8148	0.9294	0.9582
	RMSE	20.7492	12.7600	11.7792
	NRMSE	12.4897	8.8012	7.2009
	AIC	94.9752	80.3894	77.9901
	t _{1/2} (h)	63.9226	85.0666	51.0628

De acordo com Rogers (1996), a tendência dos contaminantes orgânicos serem adsorvidos no lodo de esgoto pode ser avaliada a partir do coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow}). Dessa forma, compostos com log K_{ow} < 2.5 apresentam baixo potencial de sorção na matriz (Rogers, 1996). Uma vez que a tilosina apresenta log K_{ow} = 1.63, o menor caráter hidrofóbico desse antibiótico, que apresenta em sua estrutura muitos grupos polares e tem alta solubilidade em água (5 g L⁻¹), pode explicar a menor influência da adsorção na degradação da tilosina em sistemas anaeróbios (Zhang et al., 2016).

De acordo com o modelo de pseudo primeira ordem ajustado, o tempo de meia vida da tilosina na metanogênese (51.0 h ou 2.1 dias) foi menor quando comparado à hidrólise/acidogênese (63.9 h ou 2.7 dias) e acetogênese (85 h ou 3.5 dias). Tal resultado evidencia que a biodegradação da tilosina por meio da digestão anaeróbia é alcançada em tempos relativamente curtos, considerando que a concentração inicial do antibiótico (~200 mg Kg⁻¹) é reduzida à metade com menos de 4 dias, em todas as etapas.

No modelo de primeira ordem, quanto maior o valor da constante de degradação 'k', mais rápida a taxa de degradação. Logo, os resultados evidenciam que k_{metanogênese} > k_{acidogênese}

> $k_{\text{hidrólise}}$, o que significa que a metanogênese, além de apresentar a maior remoção de tilosina (88%) entre as etapas de digestão anaeróbia, foi a fase que mais favoreceu o processo no ponto de vista cinético. Entretanto, apesar da menor remoção e menor taxa de degradação (76% e $k = 0,0072\text{h}^{-1}$) obtida na etapa hidrolítica/acidogênica, cabe ressaltar a presença de dois substratos (celobiose e tilosina) que induziam competição entre microrganismos hidrolíticos, o que provavelmente afetou a taxa de degradação do fármaco. Ao contrário disso, na etapa metanogênica, o acetato já estava prontamente disponível para as arqueias metanogênicas, enquanto apenas a tilosina seria alvo dos microrganismos hidrolíticos/acidogênicos.

Gonzalez-Gil et al. (2019) reportaram que a eritromicina, que possui estrutura química muito similar à tilosina, foi biodegradada em lodo anaeróbio com taxas superiores à 80%, devido principalmente, à ação das enzimas glicosilases, que clivam o açúcar cladinose do macrolídeo, e/ou das esterases – ou serina-proteases com atividade esterase – que promovem uma hidrólise éster do grupo macrolídeo. Segundo os autores, também é possível que enzimas realizem N-desmetilação na amina terciária presente em compostos que pertencem à essa classe (Terzic et al., 2018; Gonzalez-Gil et al., 2019). Isso parece explicar, por sua vez, o fato de pelo menos $\frac{3}{4}$ da tilosina adicionada aos reatores monitorados nesta tese, ter sido removida em todas as etapas.

No entanto, a maior taxa de degradação de tilosina na etapa metanogênica ($k = 0,0116\text{h}^{-1}$), 61% maior que a fase 1 e 55% maior que a fase 2, pode ser atribuída ao efeito co-metabólico exercido pela adição de acetato ao meio. Esse efeito implica em um aumento na taxa de biodegradação de fármacos quando a atividade metabólica (enzimática) da biomassa é induzida pela adição de um substrato de crescimento específico. Em um trabalho recente, González-Gil et al. (2021) observaram que a utilização de lodo heterotrófico apresentou efeito co-metabólico para a eritromicina, que aumentou sua taxa de biotransformação em 43% quando acetato foi fornecido ao meio. Comportamento semelhante foi observado por Kennes-Veiga et al. (2021), que relatou uma correlação co-metabólica entre a atividade heterotrófica e a cinética de biotransformação de eritromicina.

No trabalho de Sanz et al. (1996), os autores reportaram que a presença de tilosina em uma concentração entre 25 a 250 mg L^{-1} em sistema anaeróbio, não promoveu nenhuma inibição nas metanogênicas acetoclásticas, o que está em acordo com os resultados apresentados no presente estudo. É válido ressaltar que a concentração dos fármacos e as condições de digestão anaeróbia (temperatura, pH) são fatores que influenciam nos efeitos dos antibióticos na digestão anaeróbia, dificultando a comparação de diferentes estudos.

Além do trabalho de Sanz et al. (1996), outros estudos ratificam que a tilosina tem menor efeito nos microrganismos metanogênicos acetoclásticos (Xiao et al., 2021). Para concentrações de tilosina entre 100 e 400 mg L⁻¹, Chelliapan et al. (2011) demonstraram que não houve inibição detectável na atividade das arqueias metanogênicas, que inclusive dominaram a população microbiana do reator anaeróbio de fluxo ascendente. No estudo de Stone et al. (2009), os efeitos da tilosina (1.1 mg L⁻¹) na degradação anaeróbia de esterco suíno não foram significativos, sendo que houve aumento na abundância relativa de *Methanosarcinaceae* em relação ao ensaio controle ao final do teste. Os resultados indicaram que o acetato e outros ácidos orgânicos de cadeia curta foram efetivamente utilizados durante a metanogênese, mesmo na presença do macrolídeo.

7.3.3. Efeito na comunidade microbiana

Na Tabela 7.3 podem ser consultados os resultados relativos aos índices de riqueza (Chao1) e de diversidade de espécies (Simpson) correspondentes a cada fase (1 – hidrólise/acidogênese (AC), 2 – acetogênese (AT) e 3 – metanogênese (M)) nos três tempos investigados (0, 96 e 288h).

É importante destacar que no ensaio da fase 1, tem-se o estímulo de espécies hidrolíticas e acidogênicas, devido à adição de celobiose como substrato, porém espécies acetogênicas podem estar presentes, enquanto as metanogênicas são inibidas pela adição de clorofórmio. No ensaio da fase 2, organismos acetogênicos foram estimulados por meio da adição de ácidos isobutírico e isovalérico, enquanto as metanogênicas foram inibidas por clorofórmio, e as espécies hidrolíticas e acidogênicas ainda podem ser encontradas. Por fim, nos experimentos da fase 3, o estímulo é direcionado às arqueias metanogênicas, com adição de ácido acético como substrato, enquanto as demais espécies citadas anteriormente podem também estar presentes.

O índice Chao1 (Riqueza de Espécies), que leva em consideração o número de espécies observadas mais “espécies raras”, revelou que no início dos experimentos em sistemas anaeróbios (t = 0h), o ensaio de fase 1 apresentou maior riqueza, seguido pela fase 3 e 2 (AC₀ > M₀ > AT₀). O índice de diversidade de Simpson leva em consideração o número de indivíduos de cada espécie observada e se aproxima de zero quando a amostra é mais diversa, indicando um menor número espécies dominantes e maior equabilidade. Observou-se que todas as amostras referentes ao tempo 0h apresentaram baixa diversidade (Índice de Diversidade > 0,8), ou seja, houve dominância de espécies e menor distribuição equitativa nas três amostras. As diferenças observadas entre os índices no início dos três ensaios podem ser atribuídas ao efeito

imediatamente da adição de cada substrato (celobiose; ácidos isobutírico e isovalérico; e ácido acético) e do agente inibidor (clorofórmio), visto que o mesmo inóculo foi utilizado para todos os ensaios.

Após 96h dos ensaios de digestão anaeróbia, observou-se uma diminuição considerável da riqueza das amostras, especialmente para os ensaios de acetogênese (fase 2) e metanogênese (fase 3). No caso do Índice de Simpson, observou-se um aumento da diversidade para o ensaio da fase 1 (hidrolítica/acidogênica), enquanto para as fases 2 e 3, houve incremento de espécies dominantes.

Ao fim dos ensaios (tempo = 288h), constatou-se uma redução ainda maior da riqueza do ensaio da fase 1, bem como um aumento da diversidade, ou seja, redução do Índice de Simpson. Em contrapartida, nas fases 2 e 3, observou-se um aumento considerável da riqueza de espécies. Porém, a diversidade do ensaio da fase 2 foi menor que no tempo inferior (96h), enquanto na fase 3 houve ligeiro aumento da diversidade, ou seja, maior equabilidade na distribuição de espécies.

Tabela 7.3: Índice estimador de riqueza e índice de diversidade para os ensaios em sistemas anaeróbios referentes às três fases (AC, AT e M) nos tempos 0h, 96h e 288h

	Estimador de Riqueza (Chao1)	Índice de diversidade (Simpson)
AC0	216,5	0,87
AT0	175,7	0,8131
M0	187,7	0,851
AC96	172,2	0,8267
AT96	61,75	0,8485
M96	116,3	0,9227
AC288	126,5	0,7912
AT288	220	0,9523
M288	234,7	0,9031

Nas amostras do tempo 0h, mais de 98% das sequências foram atribuídas a famílias pertencentes ao domínio Bacteria (Figura 7.4). As famílias Carnobacteriaceae e Peptostreptococcaceae foram recorrentes em AC0, AT0 e M0, com abundâncias relativas superiores a 10%. Sequências referentes às famílias Planococcaceae e Clostridiaceae também observadas em M0 (47%) e AC0 (16%), respectivamente. Vale destacar que os microrganismos que compõem a microbiota dos ensaios são advindos exclusivamente do inóculo, que é

composto por uma mistura de lodo anaeróbico de reator UASB com esterco de aves (50:50). Destaca-se também o enriquecimento das famílias Enterococcaceae e Anaerolineaceae, atingindo abundância relativa de 35% e 16% nos ensaios hidrolítico/acidogênico e metanogênico após 96h, respectivamente.

Com relação ao domínio Archaea (Figura 7.4), apenas a família Methanobacteriaceae apresentou-se em abundância relativa superior a 1% em pelo menos uma das amostras investigadas. No ensaio metanogênico, observou-se o enriquecimento desta família após 96h, chegando à abundância relativa de 13%.

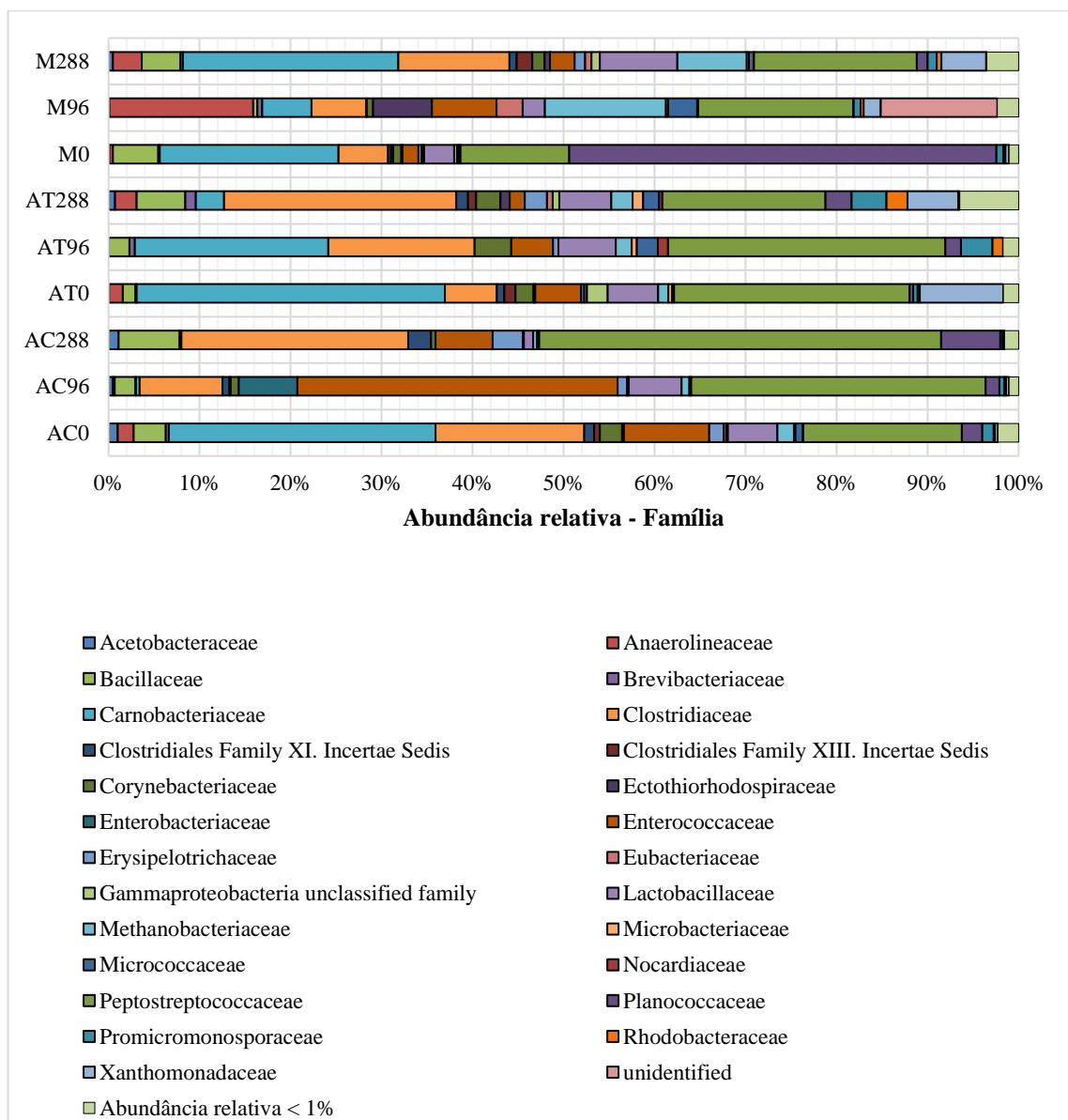


Figura 7.4: Abundância relativa a nível de família para os ensaios em sistemas anaeróbicos referentes às três fases (acidogênica - AC, acetogênica - AT e metanogênica - M) nos tempos 0h, 96h e 288h.

Após 96h de experimento, houve aumento da abundância relativa de bactérias (99,15%) para o ensaio hidrolítico/acidogênico (fase 1), provavelmente devido ao maior efeito de inibição das arqueias metanogênicas. Adicionalmente, observou-se baixa produção de H₂, aumento da concentração de AGVs, devido à degradação dos substratos por estas bactérias, e, conseqüentemente, redução do pH (Fig. 7.3a). Neste ponto, próximo ao tempo de meia-vida estimado no modelo cinético de primeira ordem (Tabela 7.2), a concentração remanescente de tilosina encontrava-se em $113,75 \pm 7,27 \text{ mg kg}^{-1}$, indicando que o antibiótico foi utilizado também como substrato pelas bactérias hidrolíticas/acidogênicas, além da celobiose.

No ensaio acetogênico (fase 2) para o tempo = 96h, esperava-se uma diminuição da abundância do reino Archaea, devido ao uso do clorofórmio. Na verdade, houve um ligeiro incremento da proporção de arqueias (1,19% para 1,72%), que pode ser considerado irrelevante, já que a produção de hidrogênio foi próxima de zero (Fig. 3b) e não foi observada produção de metano. Nesta fase, o estímulo das bactérias acetogênicas pode ser confirmado pela redução da concentração de AGVs ao longo de 96h (Fig. 7.3b), que foi convertido principalmente em acetato. A concentração de tilosina neste ponto foi de $89,61 \pm 3,44 \text{ mg kg}^{-1}$, indicando que as bactérias hidrolíticas/acidogênicas, presentes em menor proporção que as acetogênicas, ainda contribuíram para a biodegradação do antibiótico, visto que este era o único substrato disponível para esses microrganismos. Este fato ocasionou em um processo de degradação da tilosina mais rápido, quando comparado à fase 1, na qual dois substratos estavam disponíveis para as hidrolíticas/acidogênicas, confirmado por um tempo de meia-vida ligeiramente menor, considerando o modelo cinético de primeira ordem (Tabela 7.2).

No caso do ensaio metanogênico (fase 3), observou-se aumento considerável da proporção de arqueias metanogênicas (13,32%) após 96h, em resposta ao co-metabolismo estimulado pela adição de ácido acético, o que refletiu numa produção acumulada de metano de aproximadamente $4 \text{ NmL CH}_4 \text{ gCOD}^{-1}$ (Fig. 7.3c). Houve também um aumento da concentração de AGVs, possivelmente devido à conversão da tilosina, que encontrava-se em concentração de $54,87 \pm 0,28 \text{ mg kg}^{-1}$. Neste experimento, conforme destacado anteriormente, o tempo de meia-vida da tilosina foi menor (59,66h), sugerindo que a atuação conjunta entre bactérias hidrolíticas/acidogênicas, acetogênicas e arqueias metanogênicas tenha possibilitado uma degradação mais rápida do antibiótico.

Ao fim dos experimentos ($t = 288\text{h}$), constatou-se aumento da proporção de bactérias no ensaio hidrolítico/acidogênico e metanogênico em relação ao tempo anterior (96h). Isso ocorreu devido à presença de certos níveis residuais de tilosina ($\sim 50 \text{ mg kg}^{-1}$) na fase 1, que foi utilizada como substrato, e pela redução de acetato disponível para as espécies

metanogênicas (contabilizado com AGVs) na fase 3, confirmado pelo aumento na produção acumulada de metano (Fig. 7.3a e 7.3c). Já no ensaio acetogênico ocorreu uma leve diminuição da abundância relativa de bactérias, reflexo do aumento da abundância de arqueias relatada anteriormente, mesmo na presença de clorofórmio. Neste caso, assim como no ensaio metanogênico, a concentração final de tilosina foi inferior que 30 mg kg^{-1} , indicando que o antibiótico foi utilizado como substrato provavelmente pelas bactérias hidrolíticas, quando outro substrato não estava disponível.

A Figura 7.5 apresenta todos os gêneros nos quais as sequências observadas foram atribuídas, com abundância superior a 1% em pelo menos uma das nove amostras sequenciadas. De acordo com esta, os gêneros mais abundantes no início (0h) dos ensaios anaeróbios correspondentes às fases hidrolítica/acidogênica, acetogênica e metanogênica foram *Atopostipes*, *Clostridium*, *Ignatzschineria*, *Lactobacillus*, *Paenisporsarcina*, *Peptostreptococcus*, *Solibacillus* e *Vagococcus*, com abundância maior 5% que em pelo menos uma das três amostras (AC0, AT0 e M0). Com relação às arqueias metanogênicas, o gênero *Methanobacterium* foi o único detectado em abundância relativa superior a 1% em pelo menos uma das nove amostras. Algumas sequências referentes aos gêneros *Methanobrevibacter* e *Methanosaeta* também foram observadas, porém em abundância inferior a 1%.

No tempo de 96h dos três ensaios, observou-se o enriquecimento de alguns gêneros, possivelmente devido à utilização da tilosina como substrato. Os gêneros *Enterococcus*, *Peptostreptococcus* e *Providencia* apresentaram abundâncias de 27%, 32% e 6%, respectivamente, para o ensaio de fase 1, indicando a possibilidade de utilização da celobiose e tilosina como substratos para estes gêneros. A espécie *Enterococcus lemanii*, mais abundante neste caso, é anaeróbia facultativa e foi inicialmente isolada de estrume suíno (Cotta et al. 2013). De acordo com Cotta et al. (2013), a espécie utiliza celobiose como fonte de energia, podendo justificar o aumento da abundância destas no apenas no ensaio de fase 1. *Peptostreptococcus*, foi representado pela espécie *Peptostreptococcus russellii*. Esta bactéria, que é estritamente anaeróbia e foi inicialmente isolada de estrume suíno, fermenta glicose, produzindo principalmente acetato (Whitehead et al. 2011). Especialmente no experimento hidrolítico/acidogênico, foi observado um estímulo para a proliferação deste gênero, sendo este um forte candidato a biodegradador de tilosina. Manchester et al. (2019) observaram que a abundância relativa das famílias *Enterococcaceae* e *Peptostreptococcaceae* aumentou nas fazes de cachorros saudáveis durante a administração de tilosina. Os autores atribuem esse efeito à resistência antimicrobiana intrínseca ou adquirida por essas famílias, na qual era aparentemente

transiente, uma vez que removida a pressão de seleção, os grupos resistentes também perdiam sua vantagem seletiva.

No ensaio de fase 2 (acetogênico), observou-se enriquecimento especialmente dos gêneros *Clostridium* (14%) e *Peptostreptococcus* (30%). Sabe-se que espécies bacterianas do gênero *Clostridium* apresentam metabolismo acidogênico/acetogênico e produzem H_2/CO_2 (Horn, 1987), o que pode ser confirmado pelo maior crescimento do gênero no ensaio acetogênico, com adição de ácidos isobutírico e isovalérico. Bactérias pertencentes ao gênero *Peptostreptococcus* parecem ser capazes de crescer mesmo na ausência de celobiose, o que aumenta a possibilidade deste grupo ser capaz de degradar tilosina.

No ensaio de fase 3, no qual as arqueias metanogênicas foram estimuladas, foi observado o enriquecimento dos gêneros *Flexilinea* (11%) e *Methanobacterium* (13%), ainda com a presença de *Peptostreptococcus*. Apesar da adição de acetato neste ensaio, é importante destacar que a espécie *Methanobacterium kanagiense*, a mais representativa nas amostras, é metanogênica hidrogenotrófica, ou seja, produz metano a partir de hidrogênio/ CO_2 (Kitamura et al. 2011). Nesse caso, a atuação sintrófica *Clostridium/Methanobacterium* pode ter ocasionado no melhor desempenho da Fase 3 para produção de gases. O gênero *Flexilinea* foi representado por espécies isoladas inicialmente de lodo granular de reatores UASB, e utilizam açúcares como glicose e frutose, produzindo de acetato e hidrogênio (Sun et al. 2016), que podem ser utilizados pelos grupos metanogênicos como substratos. Sun et al. (2016) também relataram um aumento do crescimento desses organismos em presença da espécie metanogênica *Methanospirillum hungatei*, fato este que poderia levar uma possível influência da ocorrência de arqueias metanogênicas na abundância de *Flexilinea* no ensaio de fase 3.

O gênero *Atopostipes*, um dos mais abundantes nos ensaios anaeróbios, foi detectado com abundância de 29%, 34% e 19% nos ensaios de fases 1, 2 e 3, respectivamente, como integrante importante da microbiota do inóculo (tempo 0h). Após 96h, houve uma redução da abundância deste gênero em todos os ensaios, seguido por um incremento considerável no tempo 288h apenas no ensaio metanogênico (24%). Bactérias pertencentes a este gênero, tais como *Atopostipes suicloacalis*, são anaeróbias facultativas isoladas inicialmente de esterco suíno, e apresentam metabolismo acidogênico/acetogênico, utilizando celobiose como fonte de energia (Cotta et al. 2004). Nos ensaios de fases 1 e 2, os substratos utilizados por estes organismos podem ter se esgotado, causando um decaimento da abundância destes. A queda na concentração relativa deste gênero no tempo 96h sugere também que ele tenha pouca ou nenhuma participação da degradação da tilosina.

Outro importante grupo microbiano presente no inóculo foi o gênero *Clostridium*, representado especialmente pelas espécies *Clostridium disporicum*, *Clostridium ruminantium* e *Clostridium* sp., apresentando abundância relativa de 16%, 5% e 5%, para os ensaios hidrolítico/acidogênico, acetogênico e metanogênico, respectivamente. Vale destacar que a enzima acetato kinase, presente em diversas espécies tais como *Clostridium* sp., pode ter contribuído para a co-degradação do antibiótico tilosina, como reportado por Gonzalez-Gil, Carballa e Lema (2017) e discutido no item anterior. Ao fim do experimento (288h), observou-se um incremento na abundância do gênero *Clostridium* para todos os ensaios, possivelmente devido à disponibilidade de fontes de energia durante este tempo.

Para o gênero *Ignatzschineria*, que apresentou abundância inferior a 1% no início dos experimentos de Fase 1 e 3, observou-se tendência de aumento ao final dos experimentos acetogênicos e metanogênicos (6% e 5%). Gupta et al. (2011) relataram que estes organismos são suscetíveis ao antibiótico eritromicina, que apresenta estrutura semelhante à tilosina. Dessa forma, ao fim dos experimentos, quando a concentração remanescente do antibiótico era mais baixa, o crescimento de *Ignatzschineria* pode ter sido favorecido.

O gênero *Lactobacillus* foi detectado nos ensaios de fases 1, 2 e 3, para tempo 0h, com as respectivas abundâncias de 5%, 5% e 3%, sem mudança significativa ao longo do ensaio, exceto um pequeno aumento a 8% no ensaio metanogênico. Espécies deste gênero, como *Lactobacillus aviarius* e *Lactobacillus pontis*, fermentam açúcares como glicose, formando ácido láctico (Fujisawa et al. 1984; Vogel et al. 1994). Estas espécies usualmente não utilizam celobiose como substrato, justificando a redução da abundância do gênero no ensaio de fase 1. Possivelmente este gênero utiliza subprodutos da degradação de tilosina, visto o seu incremento especialmente entre 96h e 288h de experimento.

O gênero *Vagococcus*, representado especialmente por *Vagococcus fluvialis*, apresentou abundância de 8%, 4% e 2% no início dos ensaios de fases 1, 2 e 3, respectivamente. Ao longo dos três experimentos, por sua vez, o gênero seguiu tendências diferentes. Bactérias desta espécie foram inicialmente isoladas de animais domésticos e são acidogênicas, ou seja, produzem ácidos a partir da degradação de celobiose (Pot et al. 1994).

Alguns gêneros foram detectados em menor frequência nas amostras. O gênero *Paenisporosarcina*, representado pela espécie *Paenisporosarcina indica*, foi detectado em elevada abundância no tempo 0h apenas do ensaio de fase 3 (29%). Porém, por ser uma espécie aeróbica e possivelmente suscetível à tilosina (Reddy et al. 2013), foi eliminada logo no início do experimento. O mesmo ocorreu com o gênero *Solibacillus*, que não utiliza celobiose como substrato (Rheims et al. 1999).

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família		Fase 1			Fase 2			Fase 3			Abundância relativa (%)		
						AC0	AC96	AC288	AT0	AT96	AT288	M0	M96	M288			
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i>	1,02	0,48	1,09	0,04	0,00	0,72	0,07	0,08	0,47	0	1	
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	0,80	0,11	0,04	0,22	2,30	1,69	0,18	3,04	0,51	1	5	
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Atopostipes</i>	29,29	0,40	0,18	33,88	21,26	3,11	19,38	5,40	23,67	5	10	
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	2,50	1,49	4,00	0,83	1,15	3,31	4,52	0,30	2,53	10	25	
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>	0,32	0,05	0,00	0,13	0,57	1,16	0,18	0,53	0,26	> 25		
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	0,52	0,21	0,22	0,21	1,72	1,13	0,36	0,23	0,44			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	15,57	8,61	24,13	4,71	13,79	24,38	4,79	5,40	11,49			
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	2,47	0,91	0,51	1,97	4,02	2,68	0,90	0,68	1,33			
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	0,91	26,87	3,96	0,69	0,57	0,66	0,19	0,38	0,46			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	0,19	0,00	0,04	0,24	0,00	0,45	0,10	2,89	0,64			
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	<i>Flexilinea</i>	1,52	0,20	0,00	1,31	0,00	1,94	0,36	11,19	2,68			
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Ignatzschinera</i>	0,35	0,35	0,00	9,16	0,00	5,57	0,39	1,90	4,93			
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Promicromonosporaceae	<i>Isoptericola</i>	0,73	0,32	0,04	0,31	1,72	2,70	0,40	0,53	0,58			
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	5,43	5,80	1,02	5,52	6,32	5,71	3,31	2,44	8,49			
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Leucobacter</i>	0,17	0,08	0,18	0,39	0,57	1,09	0,14	0,23	0,22			
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	1,81	0,85	0,44	1,14	1,72	2,35	0,32	13,32	7,61			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales Family XIII. Incertae Sedis	<i>Mogibacterium</i>	0,62	0,13	0,00	1,24	0,00	0,88	0,24	0,00	1,72			
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>Paenisporosarcina</i>	0,05	0,02	0,18	0,04	0,00	0,00	29,03	0,00	0,00			
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	0,12	0,13	0,15	0,17	1,15	2,12	0,23	0,30	0,45			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Peptostreptococcus</i>	16,35	31,75	42,95	24,26	30,46	13,10	11,65	6,70	15,59			
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i>	0,00	6,39	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	0,03	0,00	0,00	0,00	1,15	0,37	0,03	0,08	0,04			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Sarcina</i>	0,20	0,27	0,51	0,20	1,72	0,61	0,12	0,08	0,23			
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>Solibacillus</i>	0,50	0,36	1,02	0,10	0,00	0,97	14,30	0,00	0,37			
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>Sporosarcina</i>	1,63	1,15	5,27	0,22	1,15	1,84	3,60	0,08	0,79			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Terrisporobacter</i>	0,68	0,41	0,87	0,13	0,00	1,17	0,15	0,15	0,32			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	<i>Tissierella</i>	1,06	0,75	2,51	0,83	0,00	1,27	0,32	0,08	1,13			
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Turicibacter</i>	1,62	1,04	3,34	0,32	0,57	2,44	0,36	0,00	1,14			
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Vagococcus</i>	8,47	8,29	2,29	4,37	4,02	1,01	1,57	6,70	2,24			
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria unclassified order	Gammaproteobacteria unclassified family	<i>Wohlfahrtiimonas</i>	0,15	0,16	0,00	2,28	0,00	0,72	0,13	0,00	0,93			
					Unidentified	0,53	0,11	0,00	1,80	0,00	4,91	0,25	34,09	2,96			
					Gêneros em abundância <1%	4,36	2,30	5,09	3,30	4,02	9,94	2,45	3,20	5,79			

Figura 7.5: Distribuição de gêneros com abundância relativa > 1% para os ensaios em sistemas anaeróbios referentes às três fases (AC, AT e M) nos tempos 0h, 96h e 288h.

Diante dos gêneros descritos, pode-se ressaltar que uma atuação sintrófica entre arqueias, como as pertencentes ao gênero *Methanobacterium*, e bactérias, como *Clostridium* e *Flexilinea*, contribuiu para a geração de determinados produtos (AGVs, acetato, hidrogênio e metano), bem como para a degradação da tilosina nos três ensaios anaeróbios testados, com destaque para o gênero *Peptostreptococcus*, possível especialista em biodegradar tilosina.

7.4. Conclusão

Resíduos de tilosina presentes em dejetos animais, podem ser efetivamente biodegradados em sistemas anaeróbios com alto teor de sólidos e, além disso, podem estimular a produção de metano em determinadas concentrações. Neste trabalho, o aumento da concentração de tilosina de 20 mg kg⁻¹ para 80 mg kg⁻¹, em digestão anaeróbia em fase sólida (ST = 15%) de esterco de aves e palha de arroz, aumentou em 45,2% a produção de metano. A biodegradação da tilosina, por sua vez, foi efetivamente realizada (> 75%) em todas as três fases da digestão anaeróbia (hidrólise/acidogênese; acetogênese; metanogênese). Espécies dos gêneros *Atopostipes*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* foram majoritariamente encontradas em todas as três fases, entretanto, destaca-se a ocorrência de *Enterococcus* na fase hidrolítica/acidogênica, e de *Flexilinea*, *Methanobacterium* e *Paenisporosarcina* na fase metanogênica. A etapa metanogênica apresentou maior taxa de degradação do antibiótico como resultado da atuação sintrófica entre microrganismos dos gêneros *Clostridium*, *Flexilinea* e *Methanobacterium*, os quais contribuíram para a co-degradação de tilosina na presença de acetato.

7.5. Referências

- Álvarez, J.A.; Otero, L.; Lema, J.M.; Omil, F. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure, *Bioresour. Technol.* 101, 8581–8586, 2010.
- Angenent, L.T., Mau, M., George, U., Zahn, J.A., Raskin, L. Effect of the presence of the antimicrobial tylosin in swine waste on anaerobic treatment. *Water Res.* 42, 2377–2384, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.005>
- Aquino, S. F.; Chernicharo, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob condições de estresse: causas e estratégias de controle. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n.2, p. 152-161, 2005.
- Apha, A. *WWE, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, twenty first ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA, 2005.
- Beneragama, N.; Lateef, S.A.; Iwasaki, M.; Yamashiro, T.; Umetsu, K. The combined effect of cefazolin and oxytertracycline on biogas production from thermophilic anaerobic digestion of dairy manure, *Bioresour. Technol.* 133, 23–30, 2013.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 13 de Janeiro de 2020, 2020.
- Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W., Berg-Lyons, D., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Fierer, N., Knight, R., n.d. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 Suppl, 4516, 2011.
- Chelliapan, S., Wilby, T., Sallis, P.J., Yuzir, A. Tolerance of the antibiotic Tylosin on treatment performance of an Up-flow Anaerobic Stage Reactor (UASR) 1599–1607, 2011. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.222>
- Chen, J., Liu, Y.S., Zhang, J.N., Yang, Y.Q., Hu, L.X., Yang, Y.Y., Zhao, J.L., Chen, F.R., Ying, G.G. Removal of antibiotics from piggery wastewater by biological aerated filter system: Treatment efficiency and biodegradation kinetics. *Bioresour. Technol.* 238, 70–77, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.023>
- Christoff A.P., Sereia A.F.R., Boberg D., Moraes R., Oliveira L. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies* 25; 2017.
- Conrad, R. & Klose, M. Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acids production on rice roots. *FEMS Microbiology Ecology* 34, 27 – 34, 2000. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00751.x
- Costa, J. C., S. G. Barbosa, M. M. Alves, and D. Z. Sousa. Thermochemical Pre- and Biological Co-Treatments to Improve Hydrolysis and Methane Production from Poultry Litter. *Bioresource Technology*, 111, pp.141–47, 2012.
- Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Collins, M. D., & Lawson, P. A. *Atopostipes suicloacale* gen. nov., sp. nov., isolated from an underground swine manure storage pit. *Anaerobe*, 10(3), 191–195, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.04.001>
- Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Falsen, E., Moore, E., & Lawson, P. A. Two novel species *Enterococcus lemanii* sp. nov. and *Enterococcus eurekaensis* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(1), 89–98, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9789-9>
- Donoso-Bravo, A.; Pérez-Elvira, S.I.; Fdz-Polanco, F. Application of simplified models for anaerobic biodegradability tests. Evaluation of pre-treatment processes, *Chem. Eng. J.* 160, 607–614, 2010.
- da Silva Rodrigues, D.A., da Cunha, C.C.R.F., Freitas, M.G., de Barros, A.L.C., e Castro, P.B.N., Pereira, A.R., de Queiroz Silva, S., da Fonseca Santiago, A., de Cássia Franco Afonso, R.J. Biodegradation of sulfamethoxazole by microalgae-bacteria consortium in wastewater treatment plant effluents. *Sci. Total Environ.* 749, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141441>
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL <https://www.fao.org>
- Fujisawa T, Shirasaka S, Watabe J, Mitsuoka T. *Lactobacillus aviarius* sp. nov.: A new species isolated from the intestine of chickens. *Systematic and Applied Microbiology* 5(3):p. 414-420, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80042-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80042-9)
- Gonzalez-Gil, L., Krah, D., Ghattas, A. K., Carballa, M., Wick, A., Helmholz, L. & Ternes, T. A. Biotransformation of organic micropollutants by anaerobic sludge enzymes. *Water research*, 152, 202-214, 2019.
- Gonzalez-Gil, L., Fernandez-Fontaina, E., Singh, R. R., Lema, J. M., Carballa, M., & Aga, D. S. Feeding composition and sludge retention time both affect (co-) metabolic biotransformation of

- pharmaceutical compounds in activated sludge systems. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105123, 2021.
- Gupta, A. K., Dharne, M. S., Rangrez, A. Y., Verma, P., Ghate, H. V., Rohde, M., Patole, M. S., & Shouche, Y. S. *Ignatzschineria indica* sp. nov. and *Ignatzschineria ureiclastica* sp. nov., isolated from adult flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 6), 1360–1369, 2011. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018622-0>
- Hansen, J.L., Ippolito, J., Ban, N., Nissen, P., Moore, P.B., Steitz, T. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* 10, 117–128, 2012. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00570-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00570-1).
- Horn, N. *Clostridium disporicum* sp. nov., a Saccharolytic Species Able to Form Two Spores per Cell, Isolated from a Rat Cecum. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 398–401, 1987. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-398>
- Kemper, N. Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment. *Ecological Indicators*, 8(1), pp.1–13, 2008.
- Kitamura, K., Fujita, T., Akada, S., & Tonouchi, A. *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from rice-field soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 6), 1246–1252, 2011. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026013-0>
- Kolz, A.C., Moorman, T.B., Ong, S.K., Scoggin, K.D., Douglass, E.A. Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons. *Water Environment Research* 77, 49 – 56, 2005.
- Li, B., Zhang, T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3468–3473, 2010. <https://doi.org/10.1021/es903490h>
- Lima, D., Adarme, O., Baêta, B., Gurgel, L., Aquino, S. Influence of different thermal pretreatments and inoculum selection on the biomethanation of sugarcane bagasse by solid-state anaerobic digestion: A kinetic analysis. *Ind. Crop. Prod.* 111, 684–693, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.048>
- Lu, X.; Zhen, G.; Liu, Y.; Hojo, T.; Estrada, A.L.; Li, Y.Y. Long-term effect of the antibiotic cefalexin on methane production during waste activated sludge anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 169, 644–651, 2014.
- Ma, Y., Wang, L., Liu, L., Zhang, X. Biodegradation of Tylosin Residue in Pharmaceutical Solid Waste by a Novel *Citrobacter amalonaticus* Strain. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 33, 676–680, 2015. <https://doi.org/10.1002/ep>
- Manchester, A.C.; Webb, C.B.; Blake, A.B.; Sarwar, F.; Lidbury, J.A.; Steiner, J.M.; Suchodolski, J.S. Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1 -13, 2019. DOI: : 10.1111/jvim.15635
- Massé, D. I; Croteau, F.; Masse, L.; and Danesh, S.. The Effeect of Scale-up on the Digestion of Swine Manure Slurry in Psychrophilic Anaerobic Sequencing Batch Reactors. *Transactions of the ASAE* 47_ (4), pp.1367–73, 2004.
- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J. Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin and tylosin. *Chemosphere*, 134, 504 – 511, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.050>
- NLM, U. Chemidplus advanced [WWW Document]. US Natl. Libr. Med., 2021 URL <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/tylosin>

- Paranhos, A.G.O.; Adarme, O.F.H.; Barreto, G.F.; Silva, S.Q.; Aquino, S.F. Methane production of co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass: Kinetic and energy assessment. *Bioresource Technology* 122588, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122588.
- Paranhos, A.G.O.; Pereira, A.R.; Fonseca, I.C.; Sanson, A.L.; Afonso, R.J.C.F.; Aquino, S.F. Analysis of tylosin in poultry litter by HPLC-UV and HPLC-MS/MS after LTPE. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2020, DOI: 10.1080/03067319.2019.1694921.
- Pereira, A.R., Paranhos, A.G.O., Aquino, S.F., Silva, S.Q. Distribution of genetic elements associated with antibiotic resistance in treated and untreated animal husbandry waste and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-13784-y
- Poels, J., Van Assche, P.; and Verstraete, W. Effects of Disinfectants and Antibiotics on the Anaerobic Digestion of Piggery Waste. *Agricultural Wastes*, 9(4), pp.239–47, 1984.
- Pot, B., Devriese, L. A., Hommez, J., Miry, C., Vandemeulebroecke, K., Kersters, K., & Haesebrouck, F. Characterization and identification of *Vagococcus fluvialis* strains isolated from domestic animals. *The Journal of applied bacteriology*, 77(4), 362–369, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03436.x>
- Reddy, G., Manasa, B. P., Singh, S. K., & Shivaji, S. *Paenisporosarcina indica* sp. nov., a psychrophilic bacterium from a glacier, and reclassification of *Sporosarcina antarctica* Yu et al., 2008 as *Paenisporosarcina antarctica* comb. nov. and emended description of the genus *Paenisporosarcina*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 8), 2927–2933, 2013. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047514-0>
- Rheims, H., Frühling, A., Schumann, P., Rohde, M., & Stackebrandt, E. *Bacillus silvestris* sp. nov., a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall. *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 2, 795–802, 1999. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-795>
- Rogers, H.R. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Sci. Total Environ.* 185, 3–26, 1996. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05039-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05039-5)
- Sanz, J.L., Rodríguez, N., Amils, R. The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 587–592, 1996. <https://doi.org/10.1007/s002530050865>
- Shimada, T.; Zilles, J.L.; Morgenroth, E.; Raskin, L. Modelling the effect of the antimicrobial tylosin on the performance of an anaerobic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 1699 – 1704, 2008. doi: 10.2166/wst.2008.108
- Stone, J.J., Clay, S.A., Zhu, Z., Wong, K.L., Porath, L.R., Spellman, G.M. Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion. *Water Res.* 43, 4740–4750, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.005>
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 125–138, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9130-2>
- Sun, L., Toyonaga, M., Ohashi, A., Matsuura, N., Tourlousse, D. M., Meng, X. Y., Tamaki, H., Hanada, S., Cruz, R., Yamaguchi, T., & Sekiguchi, Y. Isolation and characterization of *Flexilinea flocculi* gen. nov., sp. nov., a filamentous, anaerobic bacterium belonging to the class *Anaerolineae* in the phylum *Chloroflexi*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 988–996, 2016. <https://doi.org/10.1099/ijssem.0.000822>
- Vogel, R. F., Böcker, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K. H., & Hammes, W. P. Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 44(2), 223–229, 1994. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-223>

- Voigt, M., Jaeger, M. On the photodegradation of azithromycin, erythromycin and tylosin and their transformation products – a kinetic study. *Sustain. Chem. Pharm.* 5, 131 – 140, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2016.12.001>
- Wang, Q.-Q., Bradford, S.A., Zheng, W., Yates, S.R. Sulfadimethoxine Degradation Kinetics in Manure as Affected by Initial Concentration, Moisture, and Temperature. *J. Environ. Qual.* 35, 2162–2169, 2006. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0178>
- Wang, Q., Yates, S.R. Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1683–1688, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf072927p>
- Wang, Y., Quian, P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomics studies. *PLoS one* 4, e740, 2009.
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A., Falsen, E., Moore, E., & Lawson, P. A. *Peptostreptococcus russellii* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 8), 1875–1879, 2011. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023762-0>
- Wu, X., Wei, Y., Zheng, J., Zhao, X., Zhong, W. The behavior of tetracyclines and their degradation products during swine manure composting. *Bioresour. Technol.* 102, 5924–5931, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.007>
- Xiao, L., Wang, Y., Lichtfouse, E., Li, Z., Kumar, P.S., Liu, J., Feng, D., Yang, Q., Liu, F. Effect of Antibiotics on the Microbial Efficiency of Anaerobic Digestion of Wastewater: A Review. *Front. Microbiol.* 11, 1–11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.611613>
- Zhang, Q., Shu, X., Guo, X., Mo, D., Wei, S., Yang, C. Effect of ions on sorption of tylosin on clay minerals. *RSC Adv.* 6, 53175–53181, 2016. <https://doi.org/10.1039/c6ra07794c>
- Zhang, S.; Guo, H.; Du, L.; Liang, J.; Lu, X.; Li, N.; Zhang, K. Influence of NaOH and thermal pretreatment on dewatered activated sludge solubilisation and subsequent anaerobic digestion: focused on high-solid state, *Bioresource Technol.* 185, 171–177, 2015.
- Zhi, S.; Tian, L.; Lv, M.; Li, Q.; Li, J.; Wu, N.; Zhang, K. The reduction and effect of tetracycline during thermal pretreatment of dewatered sludge and subsequent high solid anaerobic digestion, *J. Residuals Sci. Technol.* 14, 99–108, 2017.
- Zhi, S., Zhang, K. Antibiotic residues may stimulate or suppress methane yield and microbial activity during high-solid anaerobic digestion. *Chem. Eng. J.* 359, 1303 – 1315, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.050>
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Riet, K.V. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881, 1990.

7.6. Anexos

Tabela 7.1S: Detalhamento do método analítico desenvolvido para quantificação de tilosina em reatores anaeróbios

Parâmetros	Método HPLC-MS/MS		
Eluição	Isocrática		
Fase móvel	50% A: Acetonitrila/ácido fórmico (0,1%) 50% B: Água/ácido fórmico (0,1%)		
Coluna	Poroshell 120 EC-C ₁₈ (4µm, 100 x 4,6 mm)		
Linha de Dessolvatação (DL)	250 °C		
Heat Block (HB)	400 °C		
Volume de Injeção	10 µL		
Tempo de Retenção	5,641 minutos		
Íon precursor [M+H] ⁺	916,40 m/z		
Íon produto	173,65 m/z		
Faixas de calibração (em 6 níveis)	20 – 1000 µg.kg ⁻¹	1 – 60 mg.kg ⁻¹	10 – 250 mg.kg ⁻¹
Curva de calibração (em solvente)	Y = 1139.8x + 7266.2	Y = 1215688.05x – 304393.45	Y = 444976.65x + 18708698.43
R ² (curva de calibração em solvente)	0,9997	0,9954	0,9915
Curva de calibração matrizada (spike antes da extração)	Y = 1034.8x – 11797	Y = 1374908.15x – 124114.86	Y = 746746.55x + 38032685.05
R ² (Curva de calibração matrizada - spike antes da extração)	0,9987	0,9992	0,9930
Curva de calibração matrizada (spike após a extração)	Y = 3451.8x – 7954.1	Y = 2560308.12 + 6940248.26	Y = 828575.03 + 63612803.10
R ² (Curva de calibração matrizada - spike após a extração)	0,9952	0,9986	0,9921
Limite de Detecção	3,45 µg.kg ⁻¹	0,32 mg.kg ⁻¹	5,34 mg.kg ⁻¹
Limite de Quantificação	11,49 µg.kg ⁻¹	1,06 mg.kg ⁻¹	17,90 mg.kg ⁻¹
Recuperação	22,27 – 38,17 %	14,86 – 52,00 %	62,83 – 84,05 %
Efeito Matriz	2,76	2,58	2,43

Tabela 7.2S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de BMP com dosagens crescentes de tilosina.

BMP ID	ENTRADA						SAÍDA										BALANÇO		
	PA:EA	TYL	CELOB	GLU	XYLO	ARAB	HFORM	HAC	HPR	HBUT (ISO)	HBUT	HVAL (ISO)	HVAL	HMF	FF	CH ₄	TYL	DIFERENÇA	BALANÇO
TYL0	1.9945	0.0000	0.0073	0.0090	0.0022	0.0000	0.0000	0.0165	1.4055	0.0000	0.0000	0.0609	0.0313	0.0090	0.0003	0.4014	0.0000	0.0513	97.43
TYL10	1.9969	0.0004	0.0075	0.0112	0.0014	0.0000	0.0000	0.0163	1.5270	0.0000	0.0000	0.0000	0.0377	0.0004	0.0000	0.4129	0.0001	-0.0170	99.15
TYL20	2.0173	0.0010	0.0088	0.0104	0.0019	0.0000	0.0000	0.2480	2.3443	0.0000	0.0000	0.0000	0.6915	0.0000	0.0000	0.4844	0.0001	0.4326	44.46
TYL30	1.9877	0.0016	0.0108	0.0122	0.0028	0.0000	0.0025	0.0156	2.0177	0.0000	0.0000	0.0124	0.0225	0.0038	0.0000	0.4432	0.0002	-0.5544	72.13
TYL50	1.9907	0.0025	0.0127	0.0175	0.0033	0.0000	0.0086	0.2410	2.6896	0.0000	0.0000	0.0000	0.6563	0.0013	0.0000	0.8317	0.0002	0.0592	97.03
TYL80	1.9882	0.0037	0.0128	0.0189	0.0035	0.0003	0.0082	0.2323	2.3714	0.0000	0.0000	0.0000	0.6922	0.0034	0.0000	0.8578	0.0003	0.0201	98.99
TYL100	1.9863	0.0049	0.0136	0.0141	0.0040	0.0004	0.0043	0.2697	2.2139	0.0000	0.0028	0.0000	0.7408	0.0000	0.0000	0.6675	0.0004	0.0597	97.00
TYL120	1.9902	0.0061	0.0147	0.0191	0.0038	0.0007	0.0085	0.0171	1.6759	0.0000	0.0000	0.0000	0.0391	0.0035	0.0000	0.7123	0.0006	-0.4990	75.00

PA:EA = Palha de arroz e esterco de aves (1:5 m.m⁻¹); TYL = tilosina; CELOB = celobiose; GLU = glicose; XYLO = xilose; ARAB = arabinose; HSUCC = ácido succínico; HFORM = ácido fórmico; HAC = ácido acético; HPR = ácido propiônico; HBUT (ISO) = ácido isobutírico; HBUT = ácido butírico; HVAL (ISO) = ácido isovalérico; HVAL = ácido valérico; HCAP = ácido capróico; HMF = 5-hidróximetilfurfural; FF = furfuraldeído.

Tabela 7.3S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de cinética da fase hidrolítica/acidogênica

TEMPO	ENTRADA				SAÍDA								BALANÇO				
	CELOB	TYL	CELOB	GLU	HSUCC	HFORM	HAC	HPR	HBUT (ISO)	HBUT	HVAL (ISO)	HVAL	HCAP	H ₂	TYL	DIFERENÇA	BALANÇO
0	1.8431	0.0102	1.3384	0.0000	0.0057	0.0000	0.1487	0.0526	0.0244	0.0360	0.0231	0.0063	0.0002	0.0000	0.0102	0.2077	88.79
1	1.8460	0.0102	1.4441	0.0000	0.0057	0.0000	0.1487	0.0526	0.0244	0.0360	0.0231	0.0063	0.0002	0.0000	0.0092	0.1059	94.29
2	1.8428	0.0102	1.4123	0.0000	0.0024	0.0000	0.1200	0.0460	0.0254	0.0387	0.0303	0.0065	0.0000	0.0000	0.0078	0.1634	91.18
4	1.8428	0.0102	1.1421	0.0000	0.0011	0.0005	0.1049	0.0386	0.0291	0.0145	0.0305	0.0000	0.0004	0.0000	0.0078	0.4833	73.92
8	1.8405	0.0105	1.2768	0.0000	0.0127	0.0010	0.4501	0.0739	0.0389	0.0598	0.0541	0.0064	0.0000	0.0000	0.0081	-0.1308	92.94
12	1.8418	0.0103	1.3887	0.0154	0.0139	0.0010	0.1395	0.0468	0.0241	0.0384	0.0381	0.0062	0.0013	0.0000	0.0076	0.1312	92.92
24	1.8409	0.0102	1.4671	0.0000	0.0202	0.0158	0.1735	0.0552	0.0261	0.0444	0.0175	0.0000	0.0000	0.0000	0.0070	0.0244	98.68
30	1.8404	0.0102	1.3043	0.0000	0.0392	0.0300	0.1967	0.0566	0.0278	0.0394	0.0272	0.0064	0.0002	0.0000	0.0073	0.1154	93.76
48	1.8366	0.0102	1.1654	0.0153	0.0203	0.0372	0.2061	0.0548	0.0210	0.0399	0.0319	0.0062	0.0006	0.0000	0.0056	0.2424	86.87
72	1.8381	0.0102	0.5838	0.0000	0.0496	0.0364	0.2337	0.0614	0.0250	0.0473	0.0275	0.0065	0.0003	0.0000	0.0062	0.7704	58.32
96	1.8378	0.0102	0.5659	0.0000	0.0244	0.0218	0.1965	0.0475	0.0167	0.0485	0.0279	0.0062	0.0000	0.0047	0.0053	0.8825	52.25
144	1.8411	0.0101	0.1808	0.0000	0.0674	0.0295	0.2857	0.0783	0.0267	0.0613	0.0069	0.0073	0.0024	0.0000	0.0037	1.1013	40.51
192	1.8413	0.0101	0.0000	0.0000	0.0537	0.0389	0.1784	0.0331	0.0146	0.0394	0.0155	0.0000	0.0007	0.0003	0.0035	1.4733	20.42
240	1.8381	0.0103	0.0000	0.0000	0.0817	0.0038	0.2282	0.0610	0.0176	0.0770	0.0323	0.0000	0.0002	0.0007	0.0029	1.3429	27.35
288	1.8142	0.0102	0.0000	0.0000	0.0330	0.0066	0.1497	0.0384	0.0382	0.0368	0.0112	0.0064	0.0004	0.0036	0.0024	1.4976	17.91

Tabela 7.4S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de cinética da fase acetogênica

TEMPO	ENTRADA				SAÍDA							BALANÇO					
	HPR	HBUT (ISO)	HVAL (ISO)	TYL	HSUCC	HFORM	HAC	HPR	HBUT (ISO)	HBUT (ISO)	HVAL (ISO)	HVAL	HCAP	H ₂	TYL	DIFERENÇA	BALANÇO
0	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0059	0.0002	0.2034	0.0622	1.0571	0.0451	1.1581	0.0066	0.0000	0.0000	0.0134	0.5560	82.11
1	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0012	0.0021	0.1928	0.0651	1.2037	0.0463	1.2391	0.0063	0.0003	0.0000	0.0130	0.3380	89.12
2	0.3093	1.3926	1.3926	0.0135	0.0019	0.0000	0.2395	0.0700	1.1853	0.0494	1.2892	0.0063	0.0002	0.0000	0.0125	0.2536	91.84
4	0.3093	1.3926	1.3926	0.0135	0.0316	0.0000	0.2065	0.0627	1.1623	0.0571	1.2535	0.0062	0.0009	0.0000	0.0120	0.3152	89.86
8	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0016	0.0002	0.2421	0.0751	1.1699	0.0596	1.1333	0.0000	0.0022	0.0000	0.0102	0.4138	86.69
12	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0093	0.0000	0.2398	0.0826	1.1994	0.0551	1.1950	0.0067	0.0017	0.0000	0.0106	0.3076	90.10
24	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0058	0.0004	0.1916	0.0623	1.0486	0.0465	1.1579	0.0062	0.0031	0.0000	0.0098	0.5759	81.47
30	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0112	0.0013	0.2392	0.0884	1.2230	0.0696	1.2816	0.0070	0.0001	0.0000	0.0113	0.1754	94.36
48	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0006	0.0005	0.2128	0.0915	1.2985	0.0495	1.4470	0.0062	0.0001	0.0000	0.0098	-0.0087	99.72
72	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0160	0.0000	0.1899	0.0994	1.1160	0.0421	1.2078	0.0066	0.0012	0.0000	0.0077	0.4211	86.45
96	0.3093	1.3926	1.3926	0.0136	0.0007	0.0001	0.1575	0.0656	0.8118	0.0337	0.8838	0.0000	0.0020	0.0001	0.0071	1.1458	63.13
144	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0047	0.0000	0.2483	0.0945	1.2432	0.0539	1.4069	0.0000	0.0012	0.0002	0.0031	0.0520	98.33
192	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0006	0.0000	0.2008	0.0963	1.0184	0.0492	1.0652	0.0000	0.0003	0.0001	0.0040	0.6731	78.34
240	0.3093	1.3926	1.3926	0.0135	0.0029	0.0000	0.2571	0.1079	1.2407	0.0642	1.3491	0.0069	0.0002	0.0002	0.0031	0.0758	97.56
288	0.3093	1.3926	1.3926	0.0134	0.0020	0.0015	0.2602	0.1080	1.1218	0.0800	1.1504	0.0000	0.0026	0.0001	0.0020	0.3792	87.80

Tabela 7.5S: Balanço material da fração líquida, em termos de DQO, dos experimentos de cinética da fase metanogênica

TEMPO	ENTRADA				SAÍDA								BALANÇO		
	HAC	TYL	HSUCC	HFORM	HAC	HPR	HBUT (ISO)	HBUT	HVAL (ISO)	HVAL	HCAP	CH ₄	TYL	DIFERENÇA	BALANÇO
0	0.3100	0.0147	0.0014	0.0004	0.0253	0.0488	0.0251	0.0354	0.0382	0.0000	0.0006	0.0000	0.0147	0.1348	58.46
1	0.3100	0.0147	0.0100	0.0000	0.1948	0.0660	0.0009	0.0572	0.0576	0.0000	0.0012	0.0000	0.0147	-0.0777	76.08
2	0.3100	0.0147	0.0004	0.0000	0.0918	0.0437	0.0318	0.0462	0.0408	0.0064	0.0012	0.0000	0.0132	0.0491	84.88
4	0.3100	0.0146	0.0014	0.0000	0.1129	0.0483	0.0359	0.0571	0.0381	0.0000	0.0004	0.0000	0.0121	0.0184	94.33
8	0.3100	0.0149	0.0007	0.0000	0.1347	0.0478	0.0256	0.0391	0.0294	0.0063	0.0011	0.0000	0.0121	0.0282	91.33
12	0.3100	0.0146	0.0030	0.0005	0.2302	0.0834	0.0365	0.0053	0.0483	0.0064	0.0007	0.0000	0.0116	-0.1012	68.82
24	0.3100	0.0146	0.0109	0.0008	0.2512	0.0301	0.0046	0.0071	0.0716	0.0063	0.0015	0.0006	0.0091	-0.0692	78.68
30	0.3100	0.0148	0.0124	0.0012	0.2269	0.0245	0.0018	0.0104	0.0616	0.0063	0.0033	0.0000	0.0103	-0.0340	89.52
48	0.3100	0.0151	0.0014	0.0000	0.2104	0.0181	0.0379	0.0136	0.0307	0.0000	0.0000	0.0084	0.0079	-0.0034	98.96
72	0.3100	0.0147	0.0107	0.0007	0.2181	0.0378	0.0336	0.0127	0.0650	0.0062	0.0026	0.0069	0.0083	-0.0779	76.01
96	0.3100	0.0149	0.0019	0.0020	0.2629	0.0384	0.0080	0.0082	0.0619	0.0066	0.0029	0.0133	0.0044	-0.0856	73.64
144	0.3100	0.0146	0.0145	0.0005	0.3002	0.0431	0.0052	0.0258	0.0793	0.0062	0.0050	0.0372	0.0028	-0.1950	39.92
192	0.3100	0.0148	0.0034	0.0064	0.2320	0.0440	0.0408	0.0275	0.0994	0.0073	0.0010	0.0321	0.0023	-0.1714	47.21
240	0.3100	0.0148	0.0019	0.0011	0.2576	0.0365	0.0374	0.0190	0.1062	0.0066	0.0005	0.0674	0.0022	-0.2118	34.78
288	0.3100	0.0148	0.0038	0.0049	0.0693	0.0093	0.0376	0.0483	0.0718	0.0000	0.0008	0.0495	0.0018	0.0276	91.49

8. PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO SEGUIDO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA PARA A REMOÇÃO DE TILOSINA E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM CAMA DE AVIÁRIO

Resumo: O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) seguido pela digestão anaeróbia (DA) é uma alternativa para a remoção de resíduos de antibióticos e genes de resistência antimicrobiana (GRAs) em lodo de esgoto e dejetos de animais. Esse estudo investigou o uso, de forma energeticamente viável, do PTH e da DA, isolados ou combinados, na produção de metano, na remoção de tilosina e de GRAs, em cama de aviário (CA). Os resultados demonstraram que o PTH a 80°C, seguido pela DA em único estágio, produziu $517,9 \pm 4,7$ NL CH₄. kgSV⁻¹, resultando em 0,11 kWh. kgCA⁻¹ de energia elétrica e 0,75 MJ. kgCA⁻¹ de energia térmica, suprimindo assim, 33,6% da energia gasta com a queima da lenha em uma típica granja. Neste melhor cenário, o uso apenas do PTH reduziu 23,6% da concentração de tilosina da CA, enquanto que o processo envolvendo o PTH seguido pela DA em único estágio removeu 91,6% de tal antibiótico. Em relação aos GRAs, no melhor cenário do processo combinado (PTH80 + DA_1S) observou-se uma redução das abundâncias absolutas e relativas para os genes *ermB* (2,13 logs), *intII* (0,39 logs), *sulI* (0,63 logs) e *tetA* (0,74 logs), e incremento dos genes *blaTEM* e *qnrB*.

Palavras-chave: Pré-tratamento hidrotérmico, genes de resistência a antibióticos, tilosina, digestão anaeróbia em único estágio, viabilidade energética.

8.1. Introdução

Tilosina é um antibiótico macrolídeo extensivamente usado como aditivo alimentar para prevenir e tratar doenças causadas por bactérias (ex. bactérias Gram-positivas), promovendo assim o crescimento saudável de animais na indústria agropecuária (Yang et al., 2020). Considerando a degradação incompleta de antibióticos utilizados como aditivos alimentares durante a digestão animal, espera-se que a maior parte da tilosina (60% - 90%) seja excretada na urina e nas fezes, levando a potenciais problemas ecológicos e à saúde humana. De fato, a tilosina já foi detectada em cama de aviário (135 – 265 µg.kg⁻¹), esterco de gado (220 – 280 µg.kg⁻¹), esterco suíno (43 – 7700 µg.kg⁻¹) e solo fertilizado com dejetos animais (6 – 679 µg.kg⁻¹) em diversos locais (Paranhos et al., 2020a; Li et al., 2013; Berendsen et al., 2015; Ho et al., 2014).

A digestão anaeróbia (DA) é um processo promissor para estabilizar os dejetos animais e, simultaneamente, gerar biogás, que é um combustível não-fóssil com grande potencial de aplicação (Yin et al., 2020). Além disso, para reduzir o risco de infecção por microrganismos patogênicos durante o manejo de dejetos animais, vários métodos de pré-tratamento adicionais, como o pré-tratamento ácido ou alcalino (Fubin et al., 2017), oxidativo (Yang et al., 2020) e o pré-tratamento térmico (Fubin et al., 2016; Yin et al., 2020), tem sido propostos em combinação com a DA.

O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) foi particularmente escolhido como método de pré-tratamento da cama de aviário neste trabalho, pelos benefícios que ele apresenta em relação aos demais, os quais incluem o aumento na superfície de contato de matrizes lignocelulósicas, favorecendo a extração de açúcares monoméricos, recuperação de pentoses e biodegradabilidade da celulose, com menor extração de compostos tóxicos, como HMF e FF (Baêta et al., 2016). Para o pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário - constituída de esterco, penas, restos de ração e biomassa lignocelulósica - é adicionada água em proporção adequada para a hidratação do seu conteúdo lignocelulósico, aumentando a acessibilidade dos microrganismos anaeróbios às frações menos biodegradáveis (Baêta et al., 2016).

Além da presença de antibióticos, a cama de aviário pode conter genes de resistência a antibióticos (GRAs), cuja produção pode ser induzida em microrganismos pela presença de antibióticos residuais em doses sub-terapêuticas (Pei et al., 2016; Zhang et al., 2019). Os GRAs deflagram nas células microbianas mecanismos de resistência fazendo com que a sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos diminua ou mesmo desapareça, resultando em antibióticos com eficiência reduzida ou mesmo ineficazes (Zhang et al., 2019). Alguns métodos de pré-tratamento tem sido investigados quanto a sua eficiência na remoção de GRAs, os quais incluem, dentre outros, tratamento térmico, filtração, desinfecção e digestão anaeróbia. (Pei et al., 2016; Zhang et al., 2019; Yang et al., 2020).

Pei et al. (2016) utilizaram pré-tratamento térmico (170°C e 30min) em esgoto doméstico e observaram redução de até 3,2 logs nos genes *tetA*, *tetG*, *tetQ*, *tetW* e *intI1* e redução total no gene *tetX*. Zhang et al. (2019), por sua vez, observaram redução dos genes *ermB* e *sull* e aumento dos genes *blaTEM* e *intI1* ao submeter esterco de aves ao pré-tratamento térmico com 121°C por 30 min. Entretanto, a avaliação da dinâmica dos GRAs, bem como das bactérias resistentes (BRAs), durante o processo integrado de pré-tratamento hidrotérmico (PTH) da cama de aviário seguido pela digestão anaeróbia (DA) em único e duplo estágios, ainda não foi estudado.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo fornecer informações inéditas (até onde sabemos) sobre o desempenho do PTH seguido pela DA em cama de aviário contendo tilosina sobre os GRAs presentes. Os objetivos específicos da pesquisa foram: (1) avaliar o PTH, a DA e o processo combinado (PTH + DA) na remoção de tilosina e GRAs e (2) avaliar a viabilidade energética em se usar o PTH na cama de aviário. Espera-se que este estudo sirva como referência na utilização do sistema PTH + DA para tratamento de resíduos avícolas contendo antibióticos.

8.2. Materiais e Métodos

8.2.1. *Materiais e Produtos Químicos*

Aproximadamente 2 kg de cama de aviário foram coletados em galpões contendo cerca de 17000 galinhas matrizes, na fase de produção (18 a 76 semanas de idade), em empresa produtora de frangos de corte, localizada em Minas Gerais, Brasil. As amostras foram coletadas no galpão durante o período operacional em que tilosina era aplicada às aves. A cama de aviário utilizada possuía teor de tilosina de 264,92 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Paranhos et al.; 2020a – capítulo 6). O inóculo para os testes de BMP foi preparado da mesma forma descrita no capítulo 5, utilizando lodo de reator UASB alimentado com esgoto doméstico, coletado na ETE Marzagão, localizada em Itabirito, Minas Gerais, Brasil.

Mistura equimolar de grau analítico contendo metano, hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio foi obtida da São Carlos Gases Ltda (Brasil). Ácido sulfúrico (95 – 98% e 99.999%) foi adquirido pela Synth (Brasil) e Sigma-Aldrich (Brasil). Acetonitrila (grau HPLC) foi obtido pela J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Padrões cromatográficos de celobiose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido capróico, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfuraldeído (FF) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). Tartarato de tilosina (padrão analítico) foi obtido pela Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

8.2.2. *Pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário*

O pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário foi realizado em reatores cilíndricos de aço 316L do tipo autoclave (16,6 cm de altura, 6,0 cm de diâmetro interno, 8,0 cm de diâmetro externo). O reator foi alimentado com 70,0 g de cama de aviário em base seca e água, para atingir a razão líquido-sólido (RLS) otimizada de 4 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, conforme descrito por Pires (2021). O reator foi aquecido a 80°C ou 98°C, em um banho de glicerina (Marconi, modelo MA

159) controlado por um termopar, pelo tempo de 12 minutos, conforme condições otimizadas por Pires (2021). Ao final do tempo de reação, o reator foi imediatamente resfriado em um banho de gelo e aberto. A perda de massa foi aferida, e as amostras de cama de aviário pré-tratadas nas duas temperaturas foram analisadas em termos da DQO e SV para prosseguir com os testes de potencial bioquímico de metano (BMP) em único (DA_1S) e duplo (DA_2S) estágios.

8.2.3. Digestão anaeróbia em único (DA_1S) e duplo (DA_2S) estágios

Experimentos de digestão anaeróbia em fase sólida em único estágio (DA_1S) da cama de aviário *in natura* e pré-tratadas, em ambas as temperaturas, foram realizados em frascos de vidro de 120 mL (reatores em batelada - BMP), no qual 50% do volume foi destinado ao *headspace* e o restante ao volume útil. Os frascos foram igualmente preenchidos com o substrato e inóculo de forma a manter a relação alimento/microrganismo (A/M) de 0,5 gSV.gSV⁻¹ (equivalente a 0,77 gDQO.gSV⁻¹) e teor de sólidos totais (ST) de 15%, conforme apresentado e discutido no capítulo 5. O pH foi ajustado em aproximadamente 9,0 com NaOH (1,0 M).

A digestão anaeróbia em duplo estágio (DA_2S) consiste na separação espacial do estágio acidogênico (produção de H₂) do estágio metanogênico (produção de CH₄). Para tanto, o inóculo utilizado na fase acidogênica foi previamente pré-tratado em autoclave a 100°C por 2h para eliminar as archeas metanogênicas e favorecer os microrganismos produtores de hidrogênio (Lima et al., 2021). Os frascos também foram preenchidos com substrato e inóculo (A/M = 0,5 gSV.gSV⁻¹, ST = 15%), e o pH foi acertado em aproximadamente 5,5 utilizando HCl (1,0 M). A partir do momento em que a produção diária de hidrogênio se estabilizou (variação menor que 5% na produção), adicionou-se o inóculo utilizado nos experimentos de DA_1S e elevou-se o pH para aproximadamente 9,0.

Para cada condição, gás N₂ foi purgado de forma a manter a anaerobiose do sistema. Os frascos foram incubados em incubadora *shaker* (Thoth, modelo 6440) e mantidos sob temperatura e agitação constantes (35°C e 180 rpm). Os experimentos foram conduzidos em duplicata, acrescidos do frasco-controle (ausência de substrato) para a verificação da produção endógena de metano pelo inóculo. A quantificação e composição do biogás foi dada segundo as condições descritas no capítulo 5, com duração de 64 dias.

Neste trabalho, a equação de Gompertz modificada (Eq. 8.1) foi utilizada para ajustar as curvas de produção acumulada de metano, e calcular a produção máxima de metano, a taxa de produção de gás e a fase lag (Zwietering et al., 1990).

$$P = P_0 \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m e}{P_0} (\lambda - 1) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. (8.1)}$$

Em que ‘P’ é o potencial de produção de metano (NL CH₄. kgSV⁻¹), ‘P₀’ é o potencial máximo de metano (NL CH₄. kgSV⁻¹), ‘μ_m’ é a taxa de produção máxima de metano (NL CH₄. kgSV⁻¹. dia⁻¹), ‘λ’ é a duração da fase lag (dias) e ‘e’ é o número de Euler.

8.2.4. Análise de genes de resistência à antibióticos (GRAs)

Para a quantificação dos genes de resistência a antibióticos, elemento móvel (IntI1) e bactérias totais nas amostras oriundas do pré-tratamento hidrotérmico, da digestão anaeróbia em único e duplo estágios, e do inóculo utilizado, utilizou-se o procedimento de preparo de amostras descrito a seguir. Primeiramente, as amostras foram lavadas, adicionando-se 50 mL das mesmas em tubos do tipo falcon, seguido pela centrifugação a 4.500 rpm durante 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado com 10 mL de solução Tampão de Fosfato Salino – PBS (140 mmol.L⁻¹ NaCl, 10 mmol.L⁻¹ Na₂HPO₄, 2 mmol.L⁻¹ KH₂PO₄, 3 mmol.L⁻¹ KCl, pH 7,2). Novamente as amostras foram levadas à centrífuga a 4.500 rpm por 10 min, descartando-se o sobrenadante ao final do processo. O *pellet* formado foi retirado e preservado a -20°C para os posteriores procedimentos de preparo e análise.

Utilizando o *pellet* anteriormente preservado, procedeu-se a extração de DNA com o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®), seguindo recomendações do fabricante. A quantificação do DNA obtido ao final do processo de extração foi realizada em um espectrofotômetro do tipo NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), na faixa de comprimento de onda de A₂₆₀/A₂₈₀ nm. Todas as amostras foram diluídas de modo a se obter uma concentração de DNA final de 5 ng μL⁻¹.

Foram selecionados seis pares de *primers* referentes aos genes de resistência relacionados às classes de antibióticos mais consumidos no Brasil: *blaTEM* (beta-lactâmicos), *ermB* (eritromicina), *qnrB* (quinolonas), *sulI* (sulfonamidas) e *tetA* (tetraciclina). Adicionalmente, também foram utilizados os *primers* referentes ao elemento genético móvel *intI1* (gene integrase de classe I) e os *primers* referentes ao DNA ribossomal 16S (RNAr 16S), para a quantificação do domínio *Bacteria*. As características de cada par de *primer* são apresentadas na Tabela 8.1.

Para a quantificação dos elementos genéticos, foram feitas análises utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (sigla qPCR do inglês

Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time) no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando a quantificação do tipo absoluta. Como reagentes, foram utilizados por reação, 3,8 μL de água ultrapura, 5,0 μL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,1 μL de cada par de *primer* (30 μM) apresentado na Tabela 8.1 e 1,0 μL de amostra de DNA (5 ng μL^{-1}), totalizando um volume final de 10 μL por reação. O gradiente de temperatura para PCR foi feito da seguinte forma: para o estágio de *holding*, utilizou-se 37 °C durante 15 min e 95 °C durante 10 min; no estágio de anelamento, foram utilizados 40 ciclos de 95 °C (10s), a temperatura da Tabela 1 para cada par de *primer* (30s) e 72 °C (30s); para curva de *Melt* foram utilizados 95 °C (15s), 60 °C (15s), 95 °C (15s) e 60 °C (15s).

Tabela 8.1: *Primers* utilizados na quantificação de GRAs em amostras de cama de aviário *in natura*, pré-tratadas e digeridas anaerobicamente.

Gene	Primer	Sequência	Temp. (°C) anelamento	Amplicon (pb)	Referência
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> fw	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	54,6	210	Mao et al. (2015)
	<i>tetA</i> rv	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> fw	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	55,8	163	Mao et al. (2015)
	<i>sulI</i> rv	TGAAGTTCCGCGCAAGGCTCG			
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> fw	CGTGCGTCTGACATCTATCTGA	56,8	190	Mao et al. (2015)
	<i>ermB</i> rv	CTGTGGTATGGCGGGTAAGTT			
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> fw	GCGACGTTCAAGTGGTTCAG	54,7	148	Mao et al. (2015)
	<i>qnrB</i> rv	TGTCCAACCTTAACGCCTTGTA			
<i>blaTEM</i>	<i>blaTEM</i> fw	GCACGAGTGGGTTACATCGA	48	311	Tao et al. (2014)
	<i>blaTEM</i> rv	GGTCCTCCGATCGTTGTCAG			
<i>intI1</i>	<i>intI1</i> fw	CCTCCCGCACGATGATC	60	280	Goldstein et al. (2001)
	<i>intI1</i> rv	TCCACGCATCGTCAGGC			
RNAr 16S	1055 fw	ATGGCTGTCGTCAGCT	53	337	Ferris; Muyzer; Ward et al. (1996)
	1392 rv	ACGGGCGGTGTGTAC			

Para a quantificação do gene RNAr 16S, alguns ajustes nessas condições foram necessários para se obter uma curva-padrão representativa. Para esse caso, utilizou-se 3,84 μL de água ultrapura, 5,0 μL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,08 μL de cada *primer* (30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e 1,0 μL de amostra de DNA (5 ng μL^{-1}), totalizando também um volume final de 10 μL por reação. Para as variações de temperatura do equipamento de qPCR, utilizou-se 95°C por 15 s, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min (30 ciclos) no estágio de ciclos, sendo mantidas as demais temperaturas e tempos dos outros estágios apresentados anteriormente.

Os controles positivos utilizados para elaboração das curvas-padrão foram obtidos por meio de clonagem do produto da PCR em vetor plasmidial (kit pGem Easy Vector, Promega) e inseridos em bactérias *E. coli* JM109, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG. A extração dos plasmídeos foi feita com o kit Midiprep (Promega),

conforme as instruções do fabricante. O DNA plasmidial de cada amostra (plasmídeo + inserto) foi quantificado no NanoDrop e estas foram congeladas a -20°C para posterior elaboração das curvas-padrão nos ensaios de PCR em tempo real.

As análises foram consideradas ideais quando alguns critérios referentes à curva-padrão foram atendidos. Esta deve apresentar $R^2 > 0,99$, inclinação da reta entre -3,1 e -3,6 e eficiência entre 90 e 110%. Todas as análises foram feitas em triplicata, tanto para a curva quanto para as amostras, incluindo um “branco”, no qual não se adicionou amostra.

A normalização das abundâncias absolutas obtidas no equipamento também foi realizada, de modo a se obter as abundâncias relativas de cada amostra. Esta foi obtida por meio da divisão entre a abundância absoluta do gene e a abundância absoluta de bactérias totais da amostra em questão, originando na abundância relativa do gene.

8.2.5. Procedimentos analíticos

As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) em refluxo aberto e fechado, Sólidos Totais (ST) e Voláteis (SV) foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Após a estabilização da produção de metano, o conteúdo dos reatores era amostrado e uma parte aliqüotada para a extração de tilosina, e a outra parte centrifugada (Microcentrífuga Herolab 14800 rpm), filtrada em membrana de acetato de celulose (Sartorius – $0,45\ \mu\text{m}$) e diluída 5 vezes para a análise de açúcares e AGVs.

A concentração dos açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e ácidos orgânicos (succínico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em equipamento Shimadzu, equipado com coluna Aminex HPX 87H ($300 \times 7,8\ \text{mm}$ – BIO-RAD) mantida a 55°C (Shimadzu, model CTO-30A), usando detector de índice de refração (Shimadzu, model RID-6A) para açúcares, e detector por arranjo de diodos (Shimadzu, model SPD-M20A) para ácidos orgânicos ($210\ \text{nm}$). Ácido sulfúrico ($5\ \text{mmol.L}^{-1}$) foi usado como eluente sob fluxo constante de $0,6\ \text{mL.min}^{-1}$.

O método de extração e detecção de tilosina modificado está descrito no capítulo 7. A quantificação de tilosina ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 916,40\ \text{m/z}$) foi realizada em LCMS-8040 triplo quadrupolo (Shimadzu-Kyoto, Japan) equipado com fonte de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI +), e coluna Poroshell 120 EC-C18 ($4\ \mu\text{m}$, $100 \times 4,6\ \text{mm}$) sob um fluxo de $0,2\ \text{mL.min}^{-1}$. Todas as demais configurações estão descritas no capítulo 6.

8.2.6. Balanço energético do processo

A viabilidade energética do processo foi avaliada por meio de um balanço de energia considerando-se a energia gasta ($E_{(-)}$ – Eq. 8.2) no pré-tratamento hidrotérmico e a energia obtida ($E_{(+)}$ – Eq. 8.3) a partir da queima do metano gerado na DA em um sistema de cogeração de calor e energia (CHP).

$$E_{(-)}/MJ \text{ kg}_{PL}^{-1} = Cp_{H_2O} m_{H_2O} (T_f - 25 \text{ }^\circ\text{C}) \quad \text{Eq. (8.2)}$$

No qual, Cp é a capacidade calorífica média da água para as temperaturas de trabalho ($4,19 \times 10^{-3} \text{ MJ (kg}^\circ\text{C)}^{-1}$), m é a massa de água utilizada (em kg) e T_f a temperatura final de trabalho. O cálculo de energia gasta $E_{(-)}$ durante o pré-tratamento foi simplificado e levou em consideração apenas a energia gasta para aquecer a água até a temperatura de trabalho, haja vista que o sistema operacional operou com 25% de sólidos ($RLS = 4 \text{ mL.g}^{-1}$) em todas as condições.

$$E_{(+)}/MJ \text{ kg}_{PL}^{-1} = \frac{NmLCH_4}{gDQO_i} \times \frac{gDQO_i}{g_{massa(PL-PTH)}} \times \frac{g_{massa(PL-PTH)}}{g_{PL}} \times \frac{1000 \text{ g}_{PL}}{kg_{PL}} \times \frac{10^{-6} m^3}{mL} \times \frac{34,5 MJ}{Nm^3 CH_4} \quad \text{Eq. (8.3)}$$

Em que, $g_{massa(PL-PTH)}$ é a massa de cama de aviário recuperada após o pré-tratamento hidrotérmico (em g). No cálculo da $E_{(+)}$, descrito na Eq. 8.3, foi considerado o ΔH° de combustão do metano igual a $34,5 \text{ MJ (Nm}^3 \text{ CH}_4)^{-1}$, bem como os rendimentos do pré-tratamento e as eficiências de conversão do sistema CHP descritas por Cano et al. (2015). De acordo com o autor, um sistema CHP convencional possui uma eficiência de combustão de 85%, sendo que a conversão de energia química em energia térmica corresponde a 65%, enquanto a conversão em energia elétrica corresponde a 35%. O saldo de energia no processo é dado pela diferença entre os valores da energia térmica gerada $E_{(+)}$ e a energia térmica consumida $E_{(-)}$ no pré-tratamento.

8.3. Resultados e Discussão

8.3.1. Influência do pré-tratamento hidrotérmico na digestão anaeróbia da cama de aviário

A Tabela 8.2 mostra a caracterização das amostras de cama de aviário *in natura* (CA) e após o pré-tratamento hidrotérmico de 80°C (PTH80) e 98°C (PTH98). É possível observar semelhança entre os teores de sólidos e a DQO_{total} medida para ambas as amostras pré-tratadas,

visto que as condições de pré-tratamento foram muito similares (HPT80 = 80°C, 4 mL.g⁻¹, 12 min e HPT98 = 98°C, 4 mL.g⁻¹, 12 min). Entretanto, a DQO_{solúvel} medida para ambas as amostras foram de 6070 ± 528 mg.L⁻¹ e 8665 ± 724 mg.L⁻¹, respectivamente, referentes à uma solubilização de 8,5% e 11,1%, em relação à massa de cama de aviário pré-tratada. Isso decorre da ação do pré-tratamento hidrotérmico na desintegração de substâncias poliméricas extracelulares presentes na cama de aviário, gerando substâncias orgânicas solúveis, tais quais carboidratos, proteínas, lipídios e AGVs (Yin et al., 2020). Cabe destacar que, apesar do pequeno grau de solubilização, o PTH promove uma desconstrução do arranjo químico da biomassa lignocelulósica, o que favorece o ataque enzimático pelos microrganismos hidrolíticos na digestão anaeróbia posterior. Em outras palavras, o PTH melhora as condições de biodegradabilidade da DQO que permanece na forma particulada após o pré-tratamento.

Tabela 8.2: Caracterização físico-química das amostras de cama de aviário *in natura* e após os pré-tratamentos à 80°C e 98°C.

Amostra	ST (%)	SV (%)	DQO _{total} (mg.L ⁻¹) ¹	DQO _{solúvel} (mg.L ⁻¹) ²	pH	AGVs _{solúvel} (mg.L ⁻¹)
CA	68,2 ± 0,5	28,6 ± 0,9	462	n.m.	n.m.	n.m.
PTH80	23,6 ± 2,1	9,0 ± 0,4	71034	6070 ± 528	8,7 ± 0,1	1410
PTH98	23,5 ± 3,1	8,7 ± 0,3	77770	8665 ± 724	8,9 ± 0,1	740

n.m.: não medido; ¹ DQO em refluxo aberto; ² DQO em refluxo fechado

A Tabela 8.3 mostra o desempenho dos reatores quanto à produção de metano e de AGVs, além dos parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtido a partir desses dados. Os resultados apresentados na Tabela 3 indicaram que o pré-tratamento hidrotérmico a 80°C seguido pela digestão anaeróbia em único estágio (PTH80_1S) propiciou a maior produção de metano, equivalente a 517,9 ± 4,7 NL CH₄. kgSV⁻¹ (101,4 NL CH₄. kgDQO⁻¹). As curvas de produção acumulada de metano estão apresentadas na Figura 8.1. De maneira geral, os experimentos realizados em único estágio (DA_1S) apresentaram produções de metano maiores do que aqueles realizados em duplo estágio (DA_2S), o que pode estar relacionado com o acúmulo de AGVs (4,6 – 14,4 g.L⁻¹) nesse último grupo, especialmente propionato, butirato e acetato (Tabela 8.1S – Anexo, item 8.6).

Segundo Aquino & Chernicharo (2005), o acúmulo de propionato e butirato em sistemas anaeróbios ocorre por limitações termodinâmicas pelo fato de as reações acetogênicas estarem próximas do equilíbrio termodinâmico em condições ambientais (com ΔG° > 0, nas condições padrão), de forma que os microrganismos sintróficos (acetogênicos) tem dificuldade de

converter esses produtos em acetato e H_2 . A inibição dos microrganismos sintróficos pelo acúmulo de produtos acidogênicos leva a um contínuo acúmulo de AGVs, o que contribui para o consumo de alcalinidade e decréscimo do pH no reator. Inclusive, menores pHs foram observados nos reatores aonde o acúmulo de AGVs foi mais acentuado (Tabela 8.3).

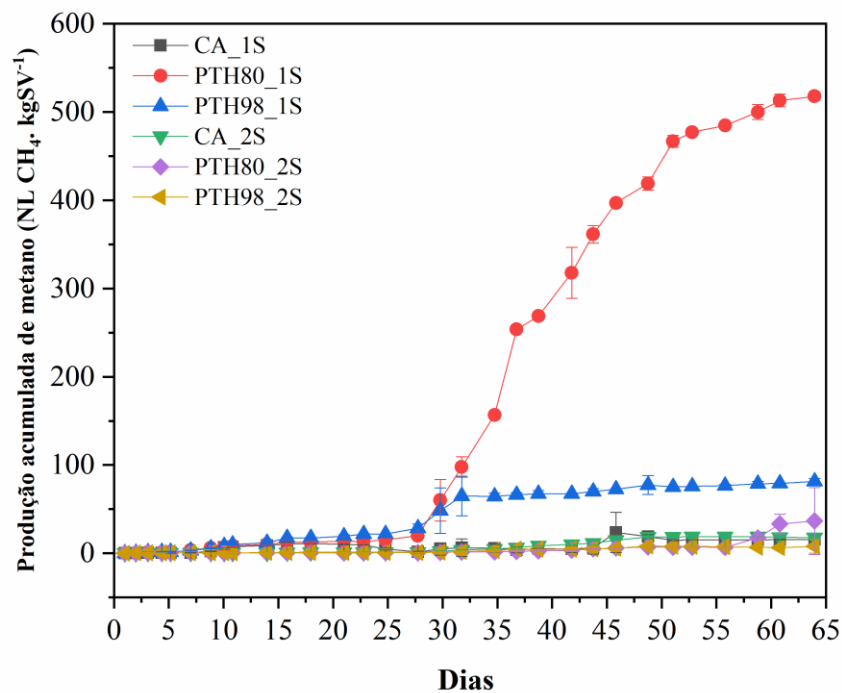


Figura 8.1: Produção acumulada de metano da cama de aviário in natura e submetida ao PTH, em único e duplo estágios.

A Tabela 8.3 mostra os parâmetros do modelo de Gompertz modificado, tais quais a taxa de produção máxima de metano (μ_m) e a fase lag (λ), obtidos a partir da produção acumulada de metano. Os valores apresentados nesta tabela indicam que o modelo possui bom ajuste aos dados experimentais devido ao elevado valor de R^2 (0,9727 – 0,9987), exceto o reator CA_1S ($R^2 = 0,7557$). A mais elevada taxa de produção máxima de metano ($\mu_m = 24,34 \text{ mL.gVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$) coincidiu com a mais elevada produção de metano ($517,86 \text{ NL CH}_4 \cdot \text{kgVS}^{-1}$), sugerindo maior adaptabilidade da microbiota no reator que foi alimentado com cama de aviário pré-tratada a 80°C e operado em único estágio.

Tabela 8.3: Desempenho dos reatores e parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir da produção acumulada de metano.

Estágio	BMP ID	R ²	μ_m (mL.g VS ⁻¹ d ⁻¹)	λ (d ⁻¹)	CH ₄ acumulado (64 dias)			pH _i	pH _f	AGVs (mg.L ⁻¹)
					Predito - P (NL.kgVS ⁻¹)	Medido (NL.kgVS ⁻¹)	Medido (NL.kgDQO ⁻¹)			
	CA_1S	0,7557	0,32 ± 0,33	9,65 ± 0,49	53,11	23,70 ± 2,92	14,65 ± 0,14	8,89	6,05	3357,08 ± 224,20
DA_1S	PTH80_1S	0,9987	24,34 ± 0,84	27,79 ± 0,35	531,50	517,86 ± 4,66	101,36 ± 0,91	9,13	7,41	1352,26 ± 134,80
	PTH98_1S	0,9872	2,70 ± 0,24	12,29 ± 1,30	84,15	81,41 ± 3,27	15,39 ± 0,62	9,01	7,52	348,98 ± 113,60
	CA_2S	0,9910	0,94 ± 0,09	29,21 ± 0,92	20,25	18,93 ± 0,38	11,57 ± 3,96	8,87	5,70	12830,42 ± 59,50
DA_2S	PTH80_2S	0,9807	6,50 ± 0,89	62,17 ± 20,57	52,09	36,61 ± 3,78	6,97 ± 0,74	8,86	5,87	4622,92 ± 313,90
	PTH98_2S	0,9727	0,34 ± 0,05	25,19 ± 1,64	7,89	8,10 ± 0,68	1,47 ± 1,88	8,89	5,77	14367,04 ± 255,60

Em relação à fase lag (λ), observou-se que, no geral, os reatores operados em duplo estágio apresentaram λ superiores aos reatores operados em único estágio. Esse fenômeno também foi relatado por Lima et al. (2021), em digestão anaeróbia em fase sólida (SS-AD) em duplo estágio, com correntes residuais do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com ozônio. Por outro lado, a fase lag do resíduo submetido ao processo combinado (PTH + DA) foi maior do que aquela apresentada pela digestão anaeróbia da cama de aviário *in natura* (CA).

Esse efeito também foi observado por Yin et al. (2020), com a submissão de esterco suíno contendo os antibióticos CTC e OTC ao processo de pasteurização (70°C – 1h), seguido ou não pela digestão anaeróbia. Os autores atribuem esse efeito à inibição da atividade microbiana pelo calor durante o processo de pasteurização, implicando em maior tempo para a aclimação microbiana ao processo de fermentação (Yin et al., 2020; Yin et al., 2016). Além disso, os rendimentos de metano previsto e medido ao final dos 64 dias foram similares, o que confirma a aplicabilidade e acurácia do modelo de Gompertz modificado para esse estudo.

8.3.2. Avaliação energética do uso do pré-tratamento hidrotérmico na cama de aviário

Os resultados do balanço energético para as condições experimentais da digestão anaeróbia da cama de aviário *in natura* em único (CA_1S) e duplo (CA_2S) estágios, bem como do resíduo pré-tratado hidrotérmicamente a 80°C (PTH80_1S e PTH80_2S) e 98°C (HPT98_1S e HPT98_2S), estão resumidos na Figura 8.2. Como visto, energia excedente foi observada em todas as condições experimentais operadas em único estágio (CA_1S, PTH80_1S e PTH98_1S) e na digestão anaeróbia em duplo estágio da cama de aviário *in natura* (CA_2S), considerando como gasto energético apenas a energia térmica necessária para o aquecimento da água durante o pré-tratamento hidrotérmico.

Os melhores resultados de energia disponível, expresso em MJ por kg de cama de aviário, foi obtido na digestão anaeróbia em único estágio da cama de aviário pré-tratada à 80°C (PTH80_1S = 0,69 MJ. kgCA⁻¹), em consequência da elevada geração de metano a partir desse resíduo (517,86 NL CH₄. kgSV⁻¹). De acordo com os resultados, neste cenário seria possível obter 0,11 kWh. kgCA⁻¹ de energia elétrica e 0,75 MJ. kgCA⁻¹ de energia térmica. Ressalta-se o ganho energético com energia elétrica no cenário PTH80_1S em comparação aos outros cenários.

A energia elétrica gerada é muito menor àquela obtida no capítulo 5 (Paranhos et al., 2020b), correspondente a 0,24 kWh. kg ave viva⁻¹, que utilizou uma mistura de excreta de aves e sabugo de milho moído *in natura* em processo SS-AD. Também é menor que o valor (0,37

kWh. kg resíduo⁻¹) reportado por Valenti et al. (2018), que utilizou uma mistura de esterco de gado, excreta de aves, silagem, polpa de citrus e bagaço de azeitona para um processo de co-digestão anaeróbia. Essa diferença pode estar atribuída ao tipo de resíduo utilizado e ao tipo de biomassa lignocelulósica constituinte, uma vez que a cama de aviário utilizada nesse trabalho, composta por palha de arroz moída, teve seu conteúdo orgânico mais biodegradável naturalmente degradado durante o tempo de permanência do resíduo no galpão, ou seja, durante a criação dos frangos de corte (~ 48 dias).

Pelo mesmo motivo, a energia térmica estimada nas condições desse trabalho – 0,75 MJ. kgCA⁻¹ ou 1,09 MJ. kg ave viva⁻¹, considerando a produção de 1,46 kgCA. kg ave viva⁻¹ (Edwards & Daniel, 1992) – foi menor do que àquela encontrada no capítulo 5 (Paranhos et al., 2020b), equivalente a 1,73 MJ. kg ave viva⁻¹. Ainda assim, o teor energético obtido a partir da DA na CA seria capaz de suprir 33,6% da energia gasta com lenha em uma típica granja, a qual corresponde a 3,25 MJ. kg ave viva⁻¹, segundo Marchioro et al. (2018). Por outro lado, no cenário similar sem o uso do pré-tratamento à 80°C (CA_1S), o teor energético obtido a partir da digestão anaeróbia seria capaz de suprir apenas 5,8% da energia gasta com lenha, a qual corresponderia à 0,56 MJ. kg ave viva⁻¹.

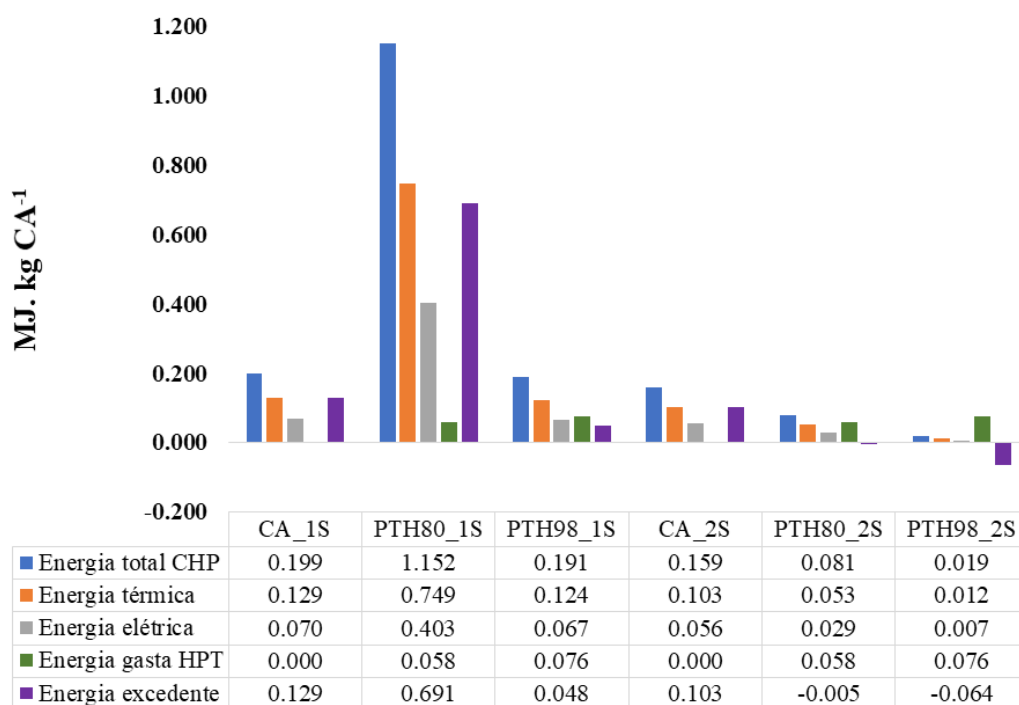


Figura 8.2: Balanço energético utilizando o sistema CHP para a digestão anaeróbia em único e duplo estágios da cama de aviário (CA) com e sem pré-tratamento hidrotérmico (PTH).

8.3.3. Influência do pré-tratamento hidrotérmico e da digestão anaeróbia da cama de aviário na remoção de tilosina

O teor de tilosina presente na cama de aviário usada neste trabalho foi de $264,92 \mu\text{g.kg}^{-1}$, conforme quantificação realizada e reportada no capítulo 6. Durante o processo PTH a 80°C e 98°C , a concentração de tilosina diminuiu para $202,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $215,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Figura 8.3), equivalente a uma remoção, provavelmente por degradação térmica, de 23,6% e 18,6%, respectivamente. Yang et al. (2020) verificaram redução na concentração de tilosina em 21,5%, 39,6% e 41,3%, ao tratarem termicamente o resíduo de borra de fermentação de tilosina a 105°C , 130°C e 160°C , respectivamente. Tais resultados parecem indicar que a tilosina não é termo-lábil. Para fins de comparação, Yin et al. (2020) observaram remoções de 71% e 38%, de CTC e OTC ao tratarem termicamente esterco suíno contendo esses antibióticos nas concentrações de $17,24 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $183,45 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente.

Em geral, os antibióticos – principalmente os mais hidrofóbicos - presentes no esterco estão adsorvidos aos sólidos voláteis (biomassa), de forma que o tratamento térmico, ao modificar a biomassa, contribuiu para a dessorção dos antibióticos e aumento de sua concentração dissolvida (Zhang & Li, 2018). No entanto, neste trabalho, o processo PTH diminuiu a concentração total de tilosina, o que pode ser atribuído à hidrólise parcial do antibiótico em altas temperaturas (Mitchell et al., 2015). Assim, acredita-se que a ação do PTH em aumentar a taxa de dessorção e diminuir a concentração de tilosina, seja função de suas características químicas (Wallace et al., 2018).

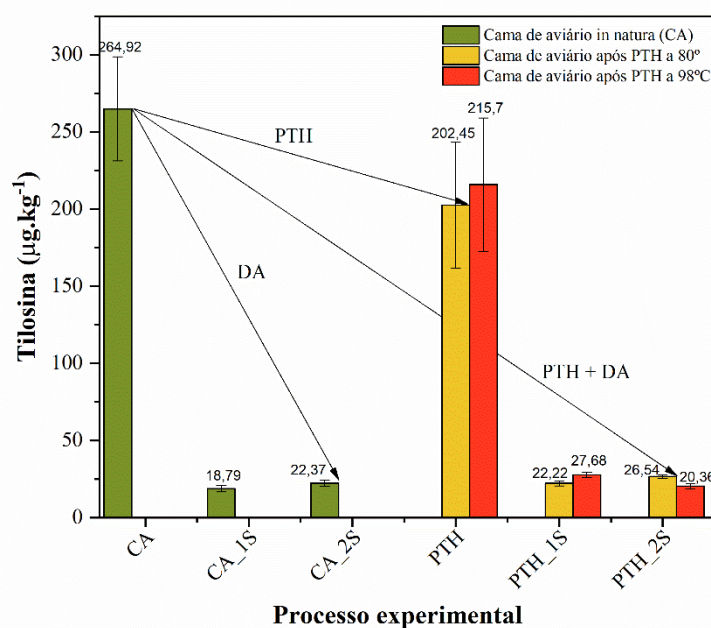


Figura 8.3: Mudanças no teor de tilosina após a digestão anaeróbia (DA) da cama de aviário, após o pré-tratamento hidrotérmico (PTH) e após o processo combinado (PTH + DA).

No entanto, em sistemas anaeróbios, a biodegradação é o mecanismo considerado mais importante na remoção de antibióticos, uma vez que estes são usados como fonte de carbono e energia para o crescimento celular e/ou são degradados fortuitamente por enzimas provenientes da comunidade microbiana no processo conhecido como co-metabolismo (Yin et al., 2020). A concentração de tilosina na cama de aviário (CA) foi reduzida para $18,79 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (92,91%) e $22,37 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (91,55%), após a digestão anaeróbia em único e duplo estágios, respectivamente. Em relação ao processo combinado (PTH + DA), foram observadas remoções de 91,61% e 89,98% a 80°C , e 89,55% e 92,31% a 98°C , em único e duplo estágios, respectivamente. Segundo o teste de Tuckey, não há diferença significativa ($p\text{-valor} > 0,05$) nos valores de eficiências de remoção de tilosina obtidos na digestão anaeróbia em único ou duplo estágio. Da mesma forma, não houve diferença estatística significativa, ao se submeter a cama de aviário ao processo PTH + DA.

Ao contrário do observado no presente trabalho, Yang et al. (2020) verificou acentuada remoção de tilosina, no resíduo de borra de fermentação de tilosina, ao submetê-lo à um pré-tratamento térmico (130°C) oxidativo (H_2O_2 15% m.v⁻¹) seguido de compostagem por 15 dias. Os autores relataram que o uso do processo combinado foi capaz de remover 97,1% da tilosina presente no resíduo, ao passo que apenas a compostagem removeu 70,8%. Por outro lado, Yin et al. (2020) usando um processo similar ao testado no presente trabalho para a remoção de CTC e OTC de esterco suíno, observou um pequeno aumento da remoção dos antibióticos com o uso do processo combinado (pasteurização 70°C + DA) em comparação com a DA do resíduo *in natura*. Isso pode estar relacionado à maior instabilidade térmica das tetraciclina em relação aos macrolídeos (Mitchell et al., 2015).

De acordo com os resultados apresentados, é possível concluir que, apesar de não haver diferença significativa entre a remoção de tilosina obtida entre os processos com PTH e sem PTH e, tampouco entre as duas temperaturas de pré-tratamento testadas (80°C e 98°C), o processo envolvendo o pré-tratamento à 80°C seguido pela digestão anaeróbia se mostrou mais viável energeticamente por levar a uma maior produção de metano. Por esse motivo, o processo PTH80 + DA foi selecionado para avaliar sua influência na dinâmica de GRAs presentes na cama de aviário.

8.3.4. Influência do pré-tratamento e da digestão anaeróbia da cama de aviário na dinâmica de GRAs

Para a investigação de GRAs na cama de aviário *in natura* (CA), no inóculo metanogênico (IN), amostras de cama de aviário pré-tratadas (PTH80) e após estas serem

submetidas à digestão anaeróbia em único (PTH80_1S) e duplo estágio (PTH80_2S), foram quantificados os genes de resistência a antibióticos *ermB*, *blaTEM*, *sulI*, *qnrB* e *tetA*, bem como o gene referente a elementos móveis *intI1* e o gene referente ao domínio *Bacteria* RNAr 16S (Figura 8.4). Conforme mostra o mapa de calor, foi constatada abundância absoluta do gene RNAr 16S de 8,57 logs n° cópias gene g⁻¹ na cama de aviário.

Com relação aos GRAs, o gene de resistência à eritromicina *ermB* foi o mais abundante, provavelmente influenciado pelo uso do antibiótico tilosina – que pertence à classe dos macrolídeos, assim como a eritromicina – como promotor de crescimento das aves na granja em estudo. Cabe ressaltar que, assim como para o gene de resistência à tilosina (*tlrB*), o *ermB* atua segundo o mecanismo de resistência de alteração do sítio ativo, por meio da metilação do RNA a partir da enzima metiltransferase (<https://card.mcmaster.ca/home>). Além disso, espécies do gênero *Enterococcus*, conhecidas pela sua resistência à eritromicina (<https://card.mcmaster.ca/ontology/36514>), parecem também conferir resistência à tilosina, conforme os resultados obtidos no capítulo 7 – proliferação de *Enterococcus* após 96h na fase hidrolítica/acidogênica – e os experimentos realizados por Manchester et al. (2019), que reportaram aumento da abundância relativa de espécies desse gênero nas fezes de cachorros saudáveis durante a administração de tilosina.

O inóculo metanogênico utilizado nos ensaios de digestão anaeróbia, por sua vez, apresentou abundância absoluta de 7,83 logs n° cópias RNAr 16S g⁻¹ e o GRA mais abundante foi o que codifica resistência às sulfonamidas, *sulI*, com abundância de 7,82 logs n° cópias RNAr 16S g⁻¹.

O pré-tratamento hidrotérmico do resíduo avícola a 80°C (PTH80), promoveu uma alteração no perfil dos GRAs investigados. Observou-se uma redução das abundâncias absolutas e relativas para os genes *tetA*, *ermB* e *blaTEM* (Figura 8.4 e Tabela 8.4). Isso indica que o pré-tratamento térmico pode reduzir tais genes abrigados nas bactérias, apesar de não reduzir consideravelmente a quantidade de bactérias totais, sejam elas resistentes ou não. Ao contrário disso, constatou-se que os genes *intI1* e *sulI* parecem persistir, após o pré-tratamento e a digestão anaeróbia, nos mesmos níveis absolutos do resíduo avícola, muito embora sua abundância relativa seja aumentada. Para o gene *qnrB*, observou-se um aumento tanto da abundância absoluta quanto da abundância relativa em HPT80, sugerindo que o pré-tratamento hidrotérmico promoveu a seleção de bactérias que carregam os genes *sulI*, *qnrB* e *intI1*.

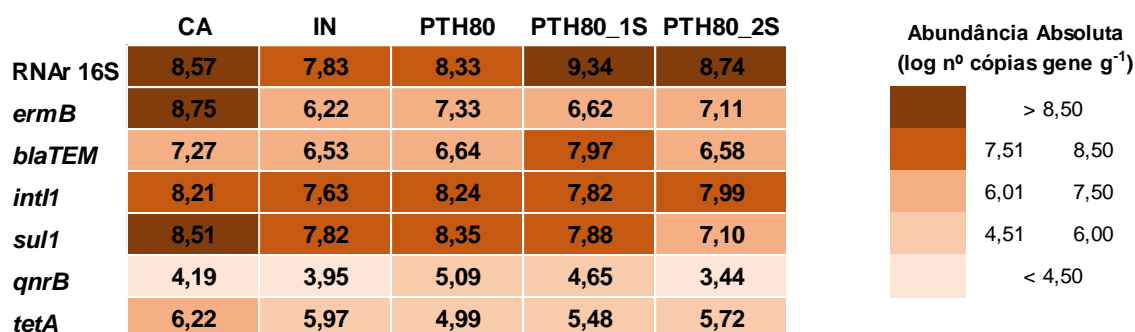


Figura 8.4: *Heatmap* mostrando a dinâmica da abundância absoluta de RNAr, IntI1 e GRAs durante o processo experimental envolvendo o pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário seguido pela digestão anaeróbia.

Tabela 8.4: Log da abundância relativa dos genes investigados no processo experimental envolvendo o pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário seguido pela digestão anaeróbia.

	CA	PTH80	PTH80_1S	PTH80_2S	IN
<i>intI1</i>	-0,36	-0,09	-1,53	-0,75	-0,20
<i>sul1</i>	-0,06	0,02	-1,46	-1,65	-0,02
<i>tetA</i>	-2,35	-3,34	-3,87	-3,02	-1,87
<i>ermB</i>	0,18	-0,99	-2,72	-1,63	-1,61
<i>blaTEM</i>	-1,30	-1,69	-1,37	-2,16	-1,30
<i>qnrB</i>	-4,38	-3,24	-4,70	-5,30	-3,88

Como pontuado por Gurmessia et al. (2020), poucos estudos reportam os efeitos da digestão anaeróbia e do pré-tratamento térmico do resíduo avícola na dinâmica de genes de resistência, sendo que a maioria deles são direcionados à investigação dos efeitos da compostagem na abundância de GRAs nesse tipo de resíduo (Pereira et al. 2021).

Zhang et al. (2019) observaram redução mais acentuada da abundância relativa do gene *ermB* após tratamento térmico (121 °C; 30 min) de esterco de aves, enquanto que para o gene *sul1*, a redução foi menos brusca. Além disso, os autores observaram um aumento da abundância dos genes *blaTEM* e *intI1* (Zhang et al., 2019). Apesar de seguir mesma tendência para os genes *ermB* e *intI1*, o presente estudo identificou tendências diferentes para os demais genes, possivelmente devido às condições mais brandas utilizadas no pré-tratamento (80 °C; 12 min) que as reportadas por Zhang et al. (2019), e às características da cama de aviário.

Pei et al. (2016) testaram a eficiência da hidrólise térmica (170 °C; 30 min) para a remoção de GRAs em efluente doméstico e farmacêutico, sendo relatada redução de até 3,2

logs para os genes *tetA*, *tetG*, *tetQ* e *tetW*; 3,3 para *intI1* e remoção completa do gene *tetX*. Segundo os autores, a remoção completa do *tetX* está relacionada às características físicas da bactéria gram-negativa que carregam este gene, que é mais suscetível ao ataque físico e oxidativo (Pei et al. 2016). Uma possível justificativa para as melhores eficiências dos estudos consultados pode ser atribuída aos maiores tempos e temperaturas utilizados no tratamento térmico, quando comparados ao presente trabalho.

Após submeter o resíduo avícola pré-tratado à digestão anaeróbia com o inóculo metanogênico em único estágio (PTH80_1S), observou-se um incremento dos níveis absolutos de bactérias totais, provavelmente devido à incorporação e proliferação de espécies advindas no inóculo, bem como do processo de digestão anaeróbia que estimula o crescimento bacteriano. Apesar disso, a digestão anaeróbia possibilitou uma redução das abundâncias absolutas e relativas dos genes *sull*, *intI1*, *ermB* e *qnrB*. No entanto, observou-se um incremento dos genes *blaTEM* e *tetA* provavelmente devido ao crescimento de bactérias que carregam estes genes. Zhang et al. (2019) também avaliaram as abundâncias relativas dos genes *ermB*, *sull*, *blaTEM* e *intI1* na digestão anaeróbia de esterco de aves pré-tratado após 44 dias. Os autores observaram aumento da abundância de *ermB* e diminuição de *sull*, *blaTEM* e *intI1*.

As variações das características do resíduo, bem como as condições de digestão anaeróbia, tais como temperatura e tempo de operação, podem interferir na dinâmica de GRAs (Pereira et al., 2021). Com tempo de operação similar ao presente trabalho, Agga et al. (2020) observaram que, após 64 dias de digestão anaeróbia mesofílica de cama de aviário, não houve redução significativa da abundância absoluta do gene *tetA*, ao contrário do gene *ermB*, no qual observou-se diminuição da abundância. Tal resultado é semelhante ao observado no presente estudo.

A digestão anaeróbia em duplo estágio (PTH80_2S), por sua vez, apresentou níveis absolutos de redução de GRAs maiores que a digestão anaeróbia em único estágio (PTH80_1S), apesar do aumento da abundância absoluta de bactérias totais, que também foi observado em PTH80_1S. Com exceção do *tetA*, os demais genes tiveram suas abundâncias absolutas e relativas reduzidas, em comparação com os níveis de PTH80. A digestão anaeróbia em duplo estágio pareceu proporcionar aumento de bactérias que carregam o gene *tetA* e diminuição de espécies que carregam os demais genes investigados.

8.4. Conclusão

A utilização do pré-tratamento hidrotérmico a 80°C seguido pela digestão anaeróbia em único estágio, se mostrou uma alternativa energeticamente viável para a minimização dos

impactos oriundos do uso da cama de aviário. Com esse processo, a concentração de tilosina presente no resíduo foi reduzida em 91,6%. Os genes de resistência a antibióticos (*ermB*, *int11*, *sul1* e *tetA*) presentes no resíduo, também foram reduzidos, com destaque para o gene *ermB* que reduziu 2,13 logs em sua abundância absoluta. De maneira viável, o uso desse processo seria capaz de suprir 1/3 da energia gasta com a queima da lenha em uma típica granja.

8.5. Referências

- Agga, G. E., Kasumba, J., Loughrin, J. H., & Conte, E. D. Anaerobic Digestion of Tetracycline Spiked Livestock Manure and Poultry Litter Increased the Abundances of Antibiotic and Heavy Metal Resistance Genes. *Frontiers in microbiology*, 11, 614424, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.614424>
- Aquino, S.F. & Chernicharo, C.A.L. Build up of volatile fatty acids (VFA) in anaerobic reactors under stress conditions: causes and control strategies. *Eng. Sanit. Ambient.*, 10, 152-161, 2005.
- Apha, A. WWE, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twenty first ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA, 2005.
- Baêta, B.E.L., Lima, D.R.S., Adarme, O.F.H., Gurgel, L.V.A., Aquino, S.F. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 200, 137 – 146, 2016.
- Berendsen, B.J.A., Wegh, R.S., Memelink, J., Zuidema, T., Stolker, L.A.M. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*, v. 132, p. 258–268, 2015.
- Brooks, J.P.; Maxwell, S.L.; Rensing, C.; Gerba, C.P.; Pepper, I.L. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. *Can J Microbiol*; 53, pp.616–22, 2007.
- Cano, R., Pérez-Elvira, S.I., Fdz.-Polanco, F. Energy feasibility study of sludge pretreatments : A review. *Appl. Energy* 149, 176–185, 2015.
- Cheng, H. R., & Jiang, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 1, p. 55–59, 2006.
- Edwards, D. R. E Daniel, T. C. Environmental impacts of on-farm poultry waste disposal — A review. *Bioresource Technology*, v.41, p.9-33, 1992.
- Ferris, M. J.; Muyzer, G.; Ward, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 2, p. 340-346, 1996.
- Fubin, Y., Zifu, L., Dongling, W., Thomas, O., Hongmin, D. Performance of thermal pretreatment and mesophilic fermentation system on pathogen inactivation and biogas production of faecal sludge: Initial laboratory results. *Biosyst. Eng.* 2016.
- Goldstein, C. et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 723-726, 2001.

- Gurmessia, B., Pedretti, E. F., Cocco, S., Cardelli, V., & Corti, G. Manure anaerobic digestion effects and the role of pre- and post-treatments on veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes removal efficiency. *The Science of the total environment*, 721, 137532, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137532>
- Ho, Y.B.; Zakaria, M. P.; Latif, P.A.; Saari, N. Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agricultural soil in Malaysia. *Science of the Total Environment*, v. 488-489, p. 261-267, 2014.
- Kennes-Veiga, D.M.; Gonzalez-Gil, L.; Carballa, M.; Lema, J.M. The organic loading rate affects organic micropollutants' cometabolic biotransformation kinetics under heterotrophic conditions in activated sludge, *Water Res.* 189, 116587, 2011.
- Li, Y.X., Zhang, X.L., Li, W., Lu, X.F., Liu, B., Wang, J. The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces. *Environ. Monit. Assess.* v. 185, p. 2211–2220, 2013.
- Lima, D.R.S.; Paranhos, A.G.O.; Adarme, O.F.H.; Baêta, B.E.L.; Gurgel, L.V.A.; Santos, A.S.; Silva, S.Q.; Aquino, S.F. Integrated production of second-generation ethanol and biogas from sugarcane bagasse pretreated with ozone. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2021. DOI: 10.1007/s13399-020-01234-7.
- Manchester, A.C.; Webb, C.B.; Blake, A.B.; Sarwar, F.; Lidbury, J.A.; Steiner, J.M.; Suchodolski, J.S. Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1 -13, 2019. DOI: : 10.1111/jvim.15635
- Mao, D. et al. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water research*, v. 85, p. 458-466, 2015.
- Marchioro, V., Steinmetz, R.L.R., do Amaral, A.C., Gaspareto, T.C., Treichel, H., Kunz, A. Poultry Litter Solid State Anaerobic Digestion: Effect of Digestate Recirculation Intervals and Substrate/Inoculum Ratios on Process Efficiency. *Front. Sustain. Food Syst.* 2, 1–10, 2018.
- Paranhos, A.G.O.; Pereira, A.R.; Fonseca, I.C.; Sanson, A.L.; Afonso, R.J.C.F.; Aquino, S.F. Analysis of tylosin in poultry litter by HPLC-UV and HPLC-MS/MS after LTPE. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2020, DOI: 10.1080/03067319.2019.1694921.
- Paranhos, A.G.O.; Adarme, O.F.H.; Barreto, G.F.; Silva, S.Q.; Aquino, S.F. Methane production of co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass: Kinetic and energy assessment. *Bioresource Technology* 2020, 122588. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122588.
- Pereira, A.R., Paranhos, A.G.O., Aquino, S.F., Silva, S.Q. Distribution of genetic elements associated with antibiotic resistance in treated and untreated animal husbandry waste and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-13784-y
- Pei, J., Yao, H., Wang, H., Ren, J., & Yu, X. Comparison of ozone and thermal hydrolysis combined with anaerobic digestion for municipal and pharmaceutical waste sludge with tetracycline resistance genes. *Water research*, 99, 122–128, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.058>
- Pires (2021). Pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos da palha de arroz para a produção de biogás via digestão anaeróbia. *Dissertação (Mestrado) – Mayara Pires de Oliveira. Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto*, 2021.
- Tao, C. et al. Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *Science of the Total Environment*, v. 496, p.116-121, out. 2014.

- Valenti, F., Zhong, Y., Sun, M., Porto, S.M.C., Toscano, A., Dale, B.E., Sibilla, F., Liao, W. Anaerobic co-digestion of multiple agricultural residues to enhance biogas production in southern Italy. *Waste Manag.* 78, 151–157, 2018.
- Wallace, J.S., Garner, E., Pruden, A., Aga, D.S. Occurrence and transformation of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes in dairy manure treated by advanced anaerobic digestion and conventional treatment methods. *Environ. Pollut.* 236, 764–772, 2018.
- Yang, M., Ma, X., Xie, D., Wu, C., Wang, Q., Gao, M., Xu, M., Liu, S. A study towards minimizing tylosin concentration and antibiotic resistance genes in tylosin fermentation dreg fertilizer. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 104372, 2020.
- Yin, F., Dong, H., Ji, C., Tao, X., Chen, Y. Effects of anaerobic digestion on chlortetracycline and oxytetracycline degradation efficiency for swine manure. *Waste Manage.* 56, 540–546, 2016.
- Yin, F., Dong, H., Zhang, W., Zhu, Z., & Shang, B. Additional function of pasteurisation pretreatment in combination with anaerobic digestion on antibiotic removal. *Bioresource technology*, 297, 122414, 2020.
- Zhang J, Lu T, Shen P, Sui Q, Zhong H, Liu J, Tong J, Wei Y. The role of substrate types and substrate microbial community on the fate of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion. *Chemosphere* 229:461-470, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.036>
- Zhang, X., Li, R. Variation of antibiotics in sludge pretreatment and anaerobic digestion processes: Degradation and solid-liquid distribution. *Bioresour. Technol.* 255, 266–272, 2018.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Riet, K.V. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881, 1990.

8.6. Anexos

Tabela 8.1S: AGVs produzidos durante o processo PTH + DA da cama de aviário

BMP_ID	HSucc	HForm	HAc	HPr	HBut (Iso)	HBut	HVal (Iso)	HVal	HCap	TFVAs
CA_1S	21,77	n.d.	63,12	3211,60	n.d.	n.d.	9,99	50,60	23,29	3357,08
CA_2S	383,34	25,26	3081,10	7453,11	610,30	842,69	344,71	89,92	47,74	12830,42
PTH80_1S	331,37	n.d.	343,66	524,66	57,21	33,13	7,90	54,33	33,93	1352,26
PTH80_2S	19,02	46,48	1508,20	1797,00	258,09	547,73	355,41	90,98	n.d.	4622,92
PTH98_1S	51,29	22,21	30,60	99,13	38,41	n.d.	55,74	51,59	8,40	348,98
PTH98_2S	16,47	25,62	7089,39	3898,46	1462,38	1363,72	428,70	82,31	27,79	14367,04

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

	Hipótese	Situação	Conclusões obtidas
Hipótese A	A cama de aviário é um resíduo com alto conteúdo orgânico e nutricional que pode ser utilizado de forma economicamente viável para a produção de metano via digestão anaeróbia em fase sólida.	ACEITA	<ul style="list-style-type: none"> - A relação alimento/microrganismo (A/M) de 0,5 gSV. gSV⁻¹ foi significativamente melhor do que as razões 2,0 e 4,0 testadas para a SS-AD de esterco de aves e biomassa lignocelulósica. - O modelo multi-estágios de Groot se ajustou melhor aos dados de produção de metano, e sugere que a produção em estágios pode estar relacionada à aclimatação microbiana à lignina. - O uso de dejetos de aves em SS-AD é energeticamente viável para a produção de metano que, ao ser queimado, pode suprir 53,2% da demanda térmica gasta com lenha em uma típica granja brasileira.
Hipótese B	Elevadas concentrações de tilosina na cama de aviário, como é de se esperar durante o tratamento terapêutico, contribui negativamente para a produção de metano a partir desse resíduo, em decorrência da inibição dos microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia.	REJEITADA	<ul style="list-style-type: none"> - O método LTPE-HPLC-MS/MS, desenvolvido para a quantificação de tilosina em cama de aviário, foi validado com todos os parâmetros em conformidade com o estabelecido pelo MAPA. - A tilosina em concentrações inferiores à 20 mg kg⁻¹ não afetou a produção de metano, enquanto que desse teor até 80 mg kg⁻¹, apresentou um efeito estimulante na produção de metano, aumentando-a em 45,2%. - A biodegradação da tilosina foi efetivamente realizada (> 75%) em todas as fases da digestão anaeróbia, com ênfase na etapa metanogênica, que exibiu maior taxa de degradação do antibiótico, provavelmente devido à atuação sintrófica entre microrganismos do gênero <i>Clostridium</i> e <i>Methanobacterium</i>.
Hipótese C	O pré-tratamento hidrotérmico da cama de aviário, além de contribuir de forma energeticamente sustentável para aumentar a produção de biogás, leva à remoção dos agentes de resistência antimicrobiana presentes.	ACEITA	<ul style="list-style-type: none"> - Das condições testadas, o PTH a 80°C, seguido pela DA em único estágio, foi o que mais favoreceu a produção de metano, de forma que, além de suprir a demanda com o PTH, produziu energia térmica equivalente a 33,6% da energia gasta com a queima da lenha em uma típica granja. - Não houve diferença estatística significativa em se usar o PTH-DA e apenas a DA na remoção de tilosina em cama de aviário. Da mesma forma, as remoções de tilosina obtidas em DA_1S e DA_2S foram estatisticamente semelhantes. - Após o processo PTH-DA, os genes <i>tetA</i>, <i>ermB</i>, <i>sul1</i> e <i>int11</i> foram reduzidos, com destaque para o gene <i>ermB</i> que teve sua abundância absoluta reduzida em 2,13 logs.

10. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho e dos obstáculos encontrados, propõe-se, os seguintes trabalhos futuros dentro do mesmo tema da pesquisa:

- Isolamento e identificação das bactérias resistentes (BRAs) à tilosina, na amostra de cama de aviário *in natura*; após o pré-tratamento hidrotérmico; e após a digestão anaeróbia em único e duplo estágios.
- Investigação dos subprodutos gerados durante a degradação térmica da tilosina no pré-tratamento hidrotérmico;
- Investigação dos subprodutos gerados durante a biodegradação da tilosina em sistemas anaeróbios; avaliação da toxicidade desses subprodutos; e proposta de rota metabólica de biodegradação;
- Estudo do ciclo de vida em se utilizar o tratamento anaeróbio da cama de aviário, acompanhado ou não do pré-tratamento hidrotérmico, de forma a integrar a geração desses resíduos em empresa avícola com o retorno da energia térmica para a própria empresa.

11. APÊNDICES – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

A autora desta tese de Doutorado, em parceria com outros pesquisadores em projetos de pesquisa correlatos, que visaram a utilização de resíduos agroindustriais na produção de metano, bem como a remoção de agentes de resistência antimicrobiana em sistemas anaeróbios, contribuiu para a publicação dos seguintes trabalhos:

Artigos completos publicados em periódicos:

1. PEREIRA, A.R.; **PARANHOS, A.G.O.**; AQUINO, S.F.; SILVA, S.Q. Distribution of genetic elements associated with antibiotic resistance in treated and untreated animal husbandry waste and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 1, p. 1-24, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-13784-y
2. LIMA, D.R.S.; **PARANHOS, A.G.O.**; ADARME, O.F.H.; BAÊTA, B.E.L.; GURGEL, L.V.A.; DOS SANTOS, A.S.; SILVA, S.Q.; AQUINO, S.F. Integrated production of second-generation ethanol and biogas from sugarcane bagasse pretreated with ozone. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 1, p. 1-17, 2021. DOI: 10.1007/2Fs13399-020-01234-7
3. **PARANHOS, A. G. O.**; PEREIRA, A. R.; FONSECA, I. C.; SANSON, A. L.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S.F. Analysis of tylosin in poultry litter by HPLC-UV and HPLC-MS/MS after LTPE. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry (Online)*, v. 1, p. 1-18, 2020. DOI: 10.1080/03067319.2019.1694921
4. **PARANHOS, A.G.O.**; ADARME, O.F.H.; BARRETO, G.F.; SILVA, S.Q.; AQUINO, S.F. Methane production by co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass: kinetic and energy assessment. *Bioresource Technology*, v. 300, p. 122588, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122588

Artigos completos submetidos para publicação:

1. CAMARGOS, A.B.; FONSECA, Y.A.; SILVA, N.C.S.; BARRETO, E.S.; ADARME, O.F.H.; **PARANHOS, A.G.O.**; GURGEL, L.V.A.; BAÊTA, B.E.L. Production of biogas and fermentable sugars from spent brewery grains: Evaluation of one- and two-stage thermal pretreatment in an integrated biorefinery. *Journal of Environmental Chemical Engineering*
2. GOMES, M.G.; CAMARGOS, A.B.; **PARANHOS, A.G.O.**; BAÊTA, B.E.L.; BAFFI, M.A.; GURGEL, L.V.A.; PASQUINI, D. Pretreatment of sugarcane bagasse with diluted citric acid and

enzymatic hydrolysis: use of black liquor and solid fraction for biogas production. *Industrial Crops & Products*

Capítulo de livro publicado

1. ARAÚJO, J.C.; SILVA, S. Q.; AQUINO, S.F; FREITAS, D. L.; MACHADO, E.C.; PEREIRA, A. R.; **PARANHOS, A. G. O.**; DIAS, C. P. Antibiotic Resistance, Sanitation, and Public Health. In: Celia M. Manaia; Erica Donner; Ivone Vaz-Moreira; and Peiyong Hong. (Org.). *The Handbook of Environmental Chemistry - Antibiotic resistance in the Environment: A Worldwide Overview*. 1ed.Switzerland: Springer Nature, 2020, v. 1, p. 189-216.

Artigos publicados em anais de congressos:

1. **PARANHOS, A.G.O.**; BARRETO, G.F.; ADARME, O.F.H.; SILVA, S.Q.; AQUINO, S.F. Effect of food/inoculum ratio in methane production by co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass. In: 16th IWA World Conference on Anaerobic Digestion, 2019, Delft, the Nertherlands. 16th IWA Proceedings, 2019.
2. **PARANHOS, A.G.O.**; PEREIRA, A.R.; SILVA, S.Q.; AQUINO, S.F. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de tilosina em resíduo avícola. In: 30° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental - CBESA, 2019, Natal/RN. Anais do 30° CBESA, 2019.
3. PEREIRA, A.R.; DIAS, C.P.; **PARANHOS, A.G.O.**; AQUINO, S.F.; SILVA, S.Q. Dinâmica de genes de resistência a antibióticos em sistema de tratamento de dejetos suíno. In: 30° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental - CBESA, 2019, Natal/RN. Anais do 30° CBESA, 2019.
4. **PARANHOS, A.G.O.**; PEREIRA, A.R.; SILVA, S.Q.; AQUINO, S.F. Metagenomic analysis of SS-AD co-digestion of different lignocellulosic materials and poultry manure. In: Latin American Meetings on Anaerobic Digestion, 2020, Online. Latin American Meetings on Anaerobic Digestion Guidelines, 2020.
5. **PARANHOS, A.G.O.**; ADARME, O.F.H.; SILVA, S.Q.; AQUINO, S. F. Methane production by co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass: kinetic and energy assessment. In: BBEST 2020-21/BIOFUTURE SUMMIT II, 2020, Online. Anais do BBEST 2020-21/BIOFUTURE SUMMIT II, 2020.