

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Gabrielle Passos Pereira do Rosário.

Título: Efeitos da adição de N e P na degradação da cafeína por bactérias no Lago dos Manacás.

2023

Gabrielle Passos Pereira do Rosário

Título: Efeitos da adição de N e P na degradação da cafeína por bactérias no Lago dos Manacás.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: André Megali Amado.

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Passos Pereira do Rosário, Gabrielle.

Efeitos da adição de N e P na degradação da cafeína por bactérias no Lago dos Manacás. / Gabrielle Passos Pereira do Rosário. -- 2023.

26 p.

Orientador: André Megali Amado

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2023.

1. Ecologia. 2. Ecologia de Ecossistemas. 3. Biodiversidade. 4. Conservação . I. Megali Amado, André, orient. II. Título.

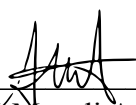
Gabrielle Passos Pereira do Rosário

Título: EFEITOS DA ADIÇÃO DE N E P NA DEGRADAÇÃO DA CAFEÍNA POR
BACTÉRIAS NO LAGO DOS MANACÁS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de Fora como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Aprovada em 13 de novembro de 2023

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. André Megali Amado - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



MSc. Layla Mayer Fonseca

Universidade Federal de Juiz de Fora



MSc. Pedro Souza

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho à minha família e amigos que estiveram presentes durante toda essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família pelo apoio e incentivo desde o começo da graduação, poder ter escolhido uma faculdade que gosto foi um privilégio concebido por todos vocês desde o momento em que vibraram comigo a minha entrada no curso.

Em especial gostaria de agradecer minha mãe, Luciane, por estar presente em todos os momentos dessa jornada, pelo acolhimento nos momentos difíceis, incentivo nos momentos de dúvidas e pelo amor o tempo todo, ter você do meu lado foi, e é essencial.

Agradeço também ao meu irmão Lucas, que mesmo sem saber, me motivou a dar o meu melhor todos os dias para que no futuro ele pudesse olhar com orgulho a minha caminhada. Sua luz é meu combustível diário.

Agradeço ao Nycolas, pelo companheirismo, carinho, amor e por todo suporte que me concedeu, sem pensar duas vezes (até mesmo à distância), durante todos os anos; você se fez presente desde o início da minha graduação e isso foi muito importante para mim.

Agradeço aos meus amigos que fizeram a graduação ser leve e divertida, em especial às minhas “Marie Currie’s” nome do grupo composto pelas melhores pessoas que eu poderia ter encontrado na faculdade. Carol você trouxe cor, risadas, afeto e memórias incríveis à minha vida, sem você o dia a dia da faculdade fica sem graça. Pietra você transparece atitude, confiança e bondade, e com isso você me possibilitou enxergar sempre um caminho nos momentos tortuosos e a abraçar as possibilidades com cabeça erguida, obrigada por isso! Mari você foi essencial dentro e fora da faculdade, com você tive a confiança de enfrentar meus maiores medos e inseguranças, o que me permitiu realizar um dos meus maiores sonhos. Quando estou com você tenho a certeza de que tudo vai ficar bem. Gratidão por tudo! Agradeço meus amigos Matheus, Pietro e Caique por segurarem minha mão quando eu estava fora, também pelas caronas, companhia e apoio principalmente no último período, no meio do caos vocês foram tranquilidade.

Agradeço também a todo time do Laboratório de Ecologia Aquática, Gladson, Mary, Lisandra e Ana pelos conhecimentos transmitidos, pelas conversas e trocas. Em especial agradeço ao André, por ter me acolhido e feito tudo possível, ter um orientador que acima de tudo é humano foi fundamental. À Layla, que desde o momento em que entrei no laboratório me auxiliou em todos os processos, com paciência e dedicação fez tudo ser mais leve, obrigada por confiar em mim diversas vezes, pelos momentos divertidos e motivação nos momentos nem tão divertidos assim. À Hanna que sempre se fez presente, me ajudando e compartilhando de risadas, angústias e conselhos desde o começo.

Aos colaboradores do projeto Aline e Jorge que possibilitaram a execução das análises, se mostrando sempre muito prestativos e compreensivos.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora por ter sido lar de um dos períodos mais importantes da minha vida.

RESUMO

A cafeína é um contaminante emergente e indicador de atividades antrópicas e, as concentrações dessa substância nos ecossistemas aquáticos têm se tornado uma preocupação devido seus potenciais riscos à biota nos ecossistemas aquáticos. Pouco se sabe sobre a degradação da cafeína em ambientes aquáticos, mas as bactérias aquáticas são fundamentais na degradação da matéria orgânica. Logo, entender a dinâmica de degradação da cafeína por bactérias aquáticas pode apontar caminhos para a mitigação dos efeitos da cafeína nos mananciais e na gestão e tratamento desse contaminante emergente. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de Nitrogênio e Fósforo na degradação da cafeína por bactérias aquáticas. Foi feita uma coleta de água no lago dos Manacás em Juiz de Fora. Foram estabelecidos 5 tratamentos com a adição de cafeína comercial e dos nutrientes Nitrogênio e Fósforo isoladamente e em conjunto, bem como 2 controles (sem adição nutrientes e sem adição da cafeína). As amostras foram incubadas no escuro em temperatura ambiente durante o período de 4 semanas. Foram realizadas amostragens de água para a determinação das concentrações de cafeína nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 dias. Foram ainda analisadas as concentrações de oxigênio dissolvido das amostras nos tempos 0 e 3 dias para a determinação das taxas de respiração bacteriana, como uma medida de metabolismo desses organismos. A adição de nitrogênio não resultou na degradação da cafeína durante todo o experimento, assim como o tratamento com somente adição de cafeína. Em contrapartida, os tratamentos com adição de P e adição de N e P combinados, resultaram na degradação total da cafeína entre 3 e 7 dias de incubação. A respiração bacteriana foi menor nos tratamentos com adição de N ou P isoladamente em relação aos demais tratamentos e controle. Isso sugere que a maior degradação da cafeína devido à adição de P não seja necessariamente resultante de maior metabolismo bacteriano. Contudo, faz-se necessário entender os efeitos desses tratamentos no balanço energético entre respiração e produção de biomassa bacteriana (i.e. eficiência de crescimento bacteriano) para melhor entender a relação da adição de nutrientes e a degradação da cafeína. Concluímos que o P foi um nutriente limitante para a degradação da cafeína nas condições do presente estudo.

Palavras-chave: Degradação da Cafeína; Contaminantes emergentes; Fósforo; Nitrogênio; Degradação bacteriana.

ABSTRACT

Caffeine is an emerging contaminant and an indicator of anthropogenic activities. The concentrations of this substance in aquatic ecosystems have become a concern due to its potential risks to biota in these environments. Little is known about caffeine degradation in aquatic environments, but aquatic bacteria play a crucial role in organic matter degradation. Therefore, understanding the dynamics of caffeine degradation by aquatic bacteria can provide insights for mitigating the effects of

caffeine in water sources and managing this emerging contaminant. The objective of this study was to assess the effects of Nitrogen and Phosphorus addition on caffeine degradation by aquatic bacteria. Water samples were collected from Manacás Lake in Juiz de Fora. Five treatments were established with the addition of commercial caffeine and Nitrogen and Phosphorus nutrients separately and in combination, along with two controls (without nutrient or caffeine addition). The samples were incubated in the dark at room temperature for 4 weeks. Water samples were collected on days 0, 3, 7, 14, and 21 to determine caffeine concentrations. Dissolved oxygen concentrations were analyzed on days 0 and 3 to determine bacterial respiration rates as a measure of organism metabolism. Nitrogen addition did not result in caffeine degradation throughout the experiment, nor did the treatment with caffeine alone. In contrast, treatments with Phosphorus addition and combined Nitrogen and Phosphorus addition resulted in total caffeine degradation between 3 and 7 days of incubation. Bacterial respiration was lower in treatments with Nitrogen or Phosphorus addition alone compared to other treatments and the control. This suggests that the increased caffeine degradation due to Phosphorus addition may not necessarily result from higher bacterial metabolism. However, it is necessary to understand the effects of these treatments on the energy balance between respiration and bacterial biomass production (i.e., bacterial growth efficiency) to better comprehend the relationship between nutrient addition and caffeine degradation. We conclude that Phosphorus was a limiting nutrient for caffeine degradation under the conditions of this study.

Keywords: Caffeine degradation; Emerging contaminants; Phosphorus; Nitrogen; Bacterial degradation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Rotas de degradação da cafeína por microrganismos	15
Figura 2	– Localização do ponto de coleta do Lago dos Manacás - (UFJF) Juiz de Fora.....	16
Figura 3	– Cronograma de coletas para análise.....	17
Figura 4	– Concentração de cafeína (ug/ml) de cada tratamento ao longo do tempo (dias). As linhas representam as médias e os pontos representam as concentrações de cafeína nas réplicas de cada tratamento.	19
Figura 5	– Taxas de respiração bacteriana (μ M/dia) por tratamento.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Média e desvio padrão das concentrações de cafeína por tratamento ao longo do tempo	18
Tabela 2	– Taxas de respiração bacteriana em $\mu\text{M}/\text{dia}$	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	METODOLOGIA.....	16
2.1	Local do estudo	16
2.2	Coleta e amostragem.....	16
2.3	Cálculos e análises.....	17
3	RESULTADOS.....	18
3.1	Concentração da cafeína observada.....	18
3.2	Degradação da cafeína ao longo do tempo.....	18
3.3	Respiração bacteriana.....	19
4	DISCUSSÃO.....	20
5	CONCLUSÃO	21
6	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população exerce impactos diretos sobre o funcionamento dos ambientes aquáticos e na ecologia microbiana (Labbate et al., 2016). As atividades humanas alteram as taxas de fornecimento de nutrientes (N, P), metais pesados, luz e temperatura, gerando grandes distúrbios ao meio aquático, como o enriquecimento excessivo de nutrientes (eutrofização), florações de cianobactérias prejudiciais e desequilíbrio na biota aquática (Paerl et al., 2013). Os microrganismos desempenham um papel crucial nos sistemas aquáticos onde contribuem na produção primária, ciclagem de nutrientes, decomposição de resíduos orgânicos, desintoxicação e resistência a metais pesados, além de atuarem na biotransformação de resíduos tóxicos em substâncias menos tóxicas ou não tóxicas, sendo fundamentais para a recuperação e manutenção dos ecossistemas aquáticos (Marshall 1980); (Gupta et al., 2017). Diariamente, contaminantes de diversas fontes são descartados em corpos d'água (Madhav et al., 2020). Os poluentes antropogênicos afetam todos os ecossistemas e comprometem a água potável, os alimentos e a qualidade do ar (Löffler et al., 2006). Os chamados contaminantes emergentes, são substâncias de origens variadas classificadas em três categorias: (1) produtos de cuidado pessoal (PCPs), (2) fármacos (PhAC) e (3) compostos desreguladores endócrinos (EDC), que apresentam um risco à saúde humana e ao ecossistema aquático, devido sua ocorrência frequente em concentrações cada vez maiores em águas residuais tratadas (Gogoi et al., 2018). Estudos geográficos da ocorrência de contaminantes emergentes apontaram que substâncias como cafeína e bisfenol A estão sempre presentes na água em valores passíveis à toxicidade ecológica devido ao lançamento contínuo de efluentes nos corpos hídricos (Tran et al., 2018). Além disso, os sistemas de tratamento de águas residuais convencionais nem sempre são eficientes para eliminá-los, sendo necessários tratamentos avançados (Morin-Crini et al., 2022).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância química de fórmula $C_8H_{10}N_4O$ do grupo das xantinas, considerada um dos psicoativos mais consumidos no mundo (Diogo et al., 2013). Pode ser encontrada naturalmente em cerca de 60 espécies de plantas além de estar presente em diversos produtos utilizados diariamente, como medicamentos, produtos alimentícios e bebidas como chás e cafés (Korekar et al., 2019). É incorporada ao ambiente aquático de diversas formas como através da utilização da cafeína como fertilizante em solos cultiváveis, resíduos industriais e principalmente através de efluentes domésticos (Canela et al. 2014). Cerca de 2% da cafeína consumida não é metabolizada pelo organismo, sendo liberada nas águas residuais (Bruton et al., 2010). O aumento do consumo da cafeína está diretamente relacionado ao crescimento populacional, segundo Quadra (2020), países em desenvolvimento como o Brasil tem aumentado o consumo de cafeína per capita, influenciando nas quantidades liberadas no ambiente aquático. A Cafeína possui alta solubilidade e estabilidade na água o que facilita sua detecção (Junior et al., 2019; Montagner et al., 2017). Com isso, atualmente a cafeína encontrada no ambiente aquático é considerada um indicador de atividade antrópica (Canela et al. 2014); (Quadra et al., 2020). No Brasil, a cafeína foi detectada em diversos corpos hídricos que possuem algum contato com esgoto, incluindo mananciais destinados ao consumo humano (Sodré et al., 2010). Além disso as concentrações de cafeína encontradas em águas superficiais brasileiras foram relativamente altas em relação a outros países com valores médios de 129,910 ng. L⁻¹ (Montagner et al., 2014); (Quadra et al., 2019).

Processos padrões de sistemas de tratamento de água como coagulação, floculação e decantação não são efetivos para a degradação de compostos orgânicos como a cafeína (Kim et al., 2007). Ainda, mesmo quando utilizam processos nos quais ocorrem efetivamente a degradação dessa substância, a entrada de cafeína nos sistemas aquáticos é muito maior do que aquela degradada (Zhou et al., 2018). Além disso, a cafeína presente nas águas residuais pode estar associada a outros contaminantes emergentes como drogas, hormônios e outros produtos de cuidado pessoal, o que torna ainda mais difícil sua eliminação (Quadra et al., 2019). Um estudo realizado no Brasil analisando águas de abastecimento públicos detectou a presença da cafeína em 93% das amostras coletadas, apresentando concentrações que variaram de 1,8 ng L⁻¹ a 2769 ng L⁻¹, porém cerca de 60% das amostras apresentaram valores abaixo de 20 ng L⁻¹ (Canela et al., 2014). Segundo Bradley (2007) substâncias como a cafeína presentes em estações de tratamento de águas residuais estão suscetíveis à biotransformação por microrganismos presentes nos sedimentos, apontando que a ausência de detecção dessas substâncias na água não necessariamente indica sua degradação no meio.

A toxicidade da cafeína foi testada e observada principalmente em peixes de água doce. Seus efeitos subletais são variados e podem afetar o ciclo circadiano dos peixes, gerar deformidades morfológicas e reduzir a atividade natatória (dos Santos et al., 2022; Cervený et al., 2022). Segundo Moore (2008) os níveis de cafeína encontrados em águas residuais são insuficientes para causar danos subletais em microrganismos aquáticos, mas ainda sim apresentam potencial risco devido a persistência dessa molécula no meio aquático. O consumo de produtos com cafeína tem aumentado em todo o Mundo; e.g. café e analgésicos (Quadra et al. 2020), mas pouco se sabe sobre a degradação da cafeína na água e seu grau de persistência. Ibrahim (2014) aponta que altas concentrações de cafeína na água podem ter ação bactericida, mas que existem microrganismos resistentes que utilizam esse alcalóide como fonte de energia e matéria. Assim, destaca-se a importância dos microrganismos no processo de descafeinação do ambiente aquático.

A utilização da atividade microbiana para eliminação de compostos tóxicos vem sendo estudada devido seu baixo custo e eficiência no ambiente aquático (Löffler et al., 2006). Os microrganismos são essenciais para biorremediação devido sua capacidade de resistência e adaptação aos mais diversos ambientes (Fetroussi et al., 2005). Por outro lado, esse processo pode ser afetado devido à falta de acesso aos contaminantes e pelas limitações dos nutrientes disponíveis no ambiente (Edwards et al., 2013). Sabendo que a adição de nutrientes nas técnicas de biorremediação pode aumentar a atividade microbiana (Christofi et al., 2002), um ambiente rico em nutrientes e contaminantes de fontes variadas como as águas residuais pode ser um ambiente propício para esse processo (Rout et al., 2021).

A degradação da cafeína por bactérias foi citada por Dash (2006) utilizando principalmente espécies isoladas de solo de cafezais ou de áreas de depósitos de café. A principal espécie citada é *Pseudomonas putida*, uma bactéria isolada do solo extremamente eficiente na remoção de cafeína em águas residuais (Ogunseitan, 1996; Juan G. Beltran et al., 2006; R. Summers et al., 2013). Grande parte desses microrganismos, utilizam a cafeína como fonte de carbono e nitrogênio (S. Gokulakrishnan et al., 2007). O catabolismo da cafeína em microrganismos, ocorre principalmente através da desmetilação, processo no qual a molécula é convertida em dimetilxantinas, como a teobromina, resultando no produto do ácido glioxílico e ureia. Além disso, existe outro caminho na qual a cafeína passa por uma rota oxidativa onde é formado o ácido 1,3,7-trimetilurico, que é degradado posteriormente

para 3,6,8-trimetilalantoína e por fim tendo como produto a dimetilureia (Figura 1) (Dash et al, 2006).

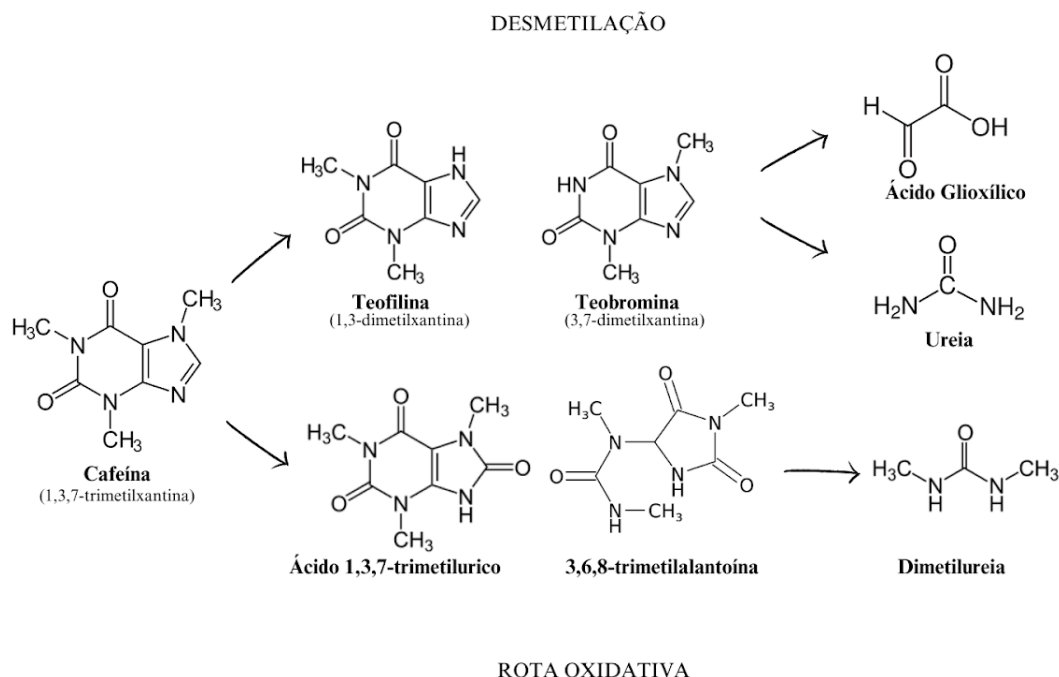


Figura 1. Rotas de degradação da cafeína por microrganismos.

Considerando que a cafeína é um composto com potenciais efeitos negativos para a biota aquática e, que tende a se acumular nas águas superficiais em vários locais do planeta, torna-se necessário buscar métodos eficientes de degradação desse composto, para se desenvolver processos adequados de gestão e tratamento de resíduos que liberam cafeína no meio. O desenvolvimento de técnicas de biodescafeinação utilizando enzimas ou microrganismos oferecem uma alternativa atraente aos atuais métodos de remoção de cafeína, que muitas vezes são caros, tóxicos ou inespecíficos. Uma vez que a cafeína geralmente está associada a lançamento de efluentes domésticos (Quadra et al. 2020), que também são ricos em nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P), podendo causar eutrofização e estimular a degradação da matéria orgânica pelas bactérias (Le Moal et al. 2019; Farjalla et al 2002), é importante entender se esses nutrientes apresentam efeito na degradação da cafeína. O fósforo é considerado um nutriente limitante em ecossistemas de água doce (Sterner et al., 1997) e por não estar presente na molécula de cafeína, é esperado que a adição deste nutriente tenha efeitos mais significativos no processo de degradação comparado aos tratamentos com adição de nitrogênio. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da adição de N e P na degradação da cafeína por bactérias aquáticas do lago dos Manacás, Juiz de Fora-MG.

2 METODOLOGIA

2.1 Local do estudo:

O Lago dos Manacás é um lago artificial, localizado no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), região oeste da cidade de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais (21°46'40"S 43°22'03"W). Possui um espelho de 1,37 ha, e aproximadamente 5 m de profundidade máxima. O grau de impacto ambiental no lago é considerado médio, com 44,5% razoável e 40,7% na classe ruim. (Oliveira et al., 2013).



Figura 2. Localização do ponto de coleta do Lago dos Manacás - (UFJF) Juiz de fora.

2.2 Coleta e amostragem:

A coleta de água do Lago dos Manacás - UFJF, foi feita à sua margem (Figura 2) em outubro de 2023, e processada no Laboratório de Ecologia Aquática da UFJF (LEA - UFJF). A priori, foi feita uma pré-filtragem com a finalidade de remover partículas em suspensão e predadores de bactérias como ciliados, com filtros de fibra de vidro (1.6 μ m-GFA, Whatman). 250 ml deste filtrado foi separado para ser utilizado como inóculo de bactérias no experimento, e o restante filtrado em um filtro Steritop (0.2 μ m, Merck Millipore), com a finalidade de excluir a maior parte das bactérias.

Foram feitos cinco tratamentos: (I) controle (apenas água do lago); (II) água do lago com adição de 50 μ m de cafeína ($C_8H_{10}N_4O$); (III) água do lago com adição de cafeína e nitrogênio (50 μ m de KNO_3); (IV) água do lago com adição de cafeína e fósforo (50 μ M KH_2PO_4); e, (V) água do lago, com adição de cafeína, nitrogênio e fósforo. Todos os tratamentos foram montados com 5 réplicas. Para a inoculação das amostras foram utilizados 25 frascos de vidro de 100 ml com tampas lavados

com HCl 3%. O meio para incubação foi composto por água filtrada em 0,2 μm + cafeína [50 μM] + nitrogênio ([50 μM] de KNO_3) + fósforo ([5 μM] de KH_2PO_4). O inóculo de bactérias (5 ml) foi adicionado para o início da incubação.

As amostras foram incubadas por 4 semanas em temperatura de 24°C em ambiente escuro. Alíquotas foram coletadas ao início da incubação, e após 3, 7, 14 e 21 dias (Figura 3). Para a determinação das concentrações de cafeína, as amostras foram acidificadas com HCl 6N e congeladas. Para a determinação da respiração bacteriana os mesmos tratamentos foram incubados em 60 exetainers nos quais foram medidos a concentração de oxigênio dissolvido (O_2) no início e após 3 dias com o uso de picoamperímetro acoplado com microsensor (Unisense) (Briand et al. 2004).

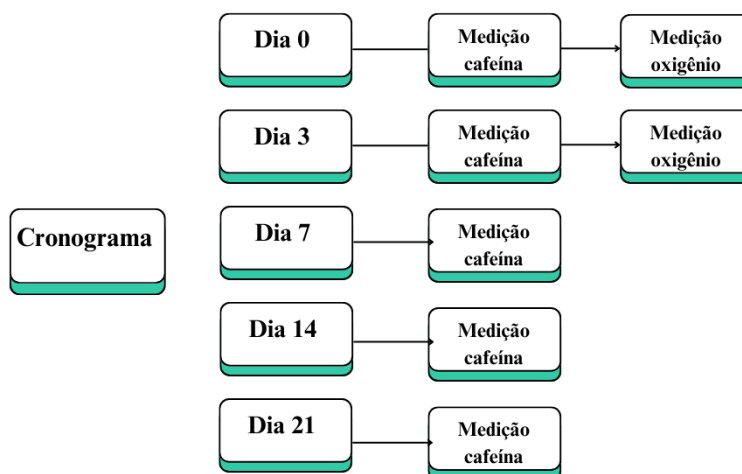


Figura 3. Cronograma de coletas para análise.

2.3 Cálculos e análises:

A análise das concentrações de cafeína em cada tratamento foi feita através do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) constituído de Módulo de Gerenciamento de Solventes e Amostras e2695 Alliance, bomba quaternária, injetor automático de amostras, degasser de fase móvel, detector UV-Vis 2489 duplo canal e forno SMH.

As medições de oxigênio foram realizadas com um microsensor conectado a um picoamperímetro (Unisense). As taxas de respiração bacteriana foram determinadas a partir da diferença entre as concentrações do dia 0 e 3. O cálculo da taxa de respiração foi feito a partir da subtração da concentração de O_2 inicial com a concentração O_2 final dividido pelo tempo de incubação (em dias), para cada amostra/réplica.

Todas as análises foram realizadas no Software de Análise Estatística JMP 17.2. Para testes entre concentração da cafeína e os tratamentos ao longo do tempo, foi utilizado a análise de variância (ANOVA-oneway) com aplicação do teste de Tukey.

As análises das taxas de respiração bacteriana também foram realizadas a partir da análise de variância (ANOVA-oneway). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Concentração da cafeína observada:

As concentrações de cafeína nos tratamentos Cafeína e Cafeína + N apresentaram valores em torno de 200 µg/ml durante todo o período estudado, não apresentando degradação. Os tratamentos Cafeína + P e Cafeína + P + N apresentaram uma queda significativa da concentração de cafeína a partir do dia 3. O tratamento controle apresentou concentrações inferiores a 0,1 µg/mL durante todo o experimento (Tabela 1).

Tempo (dias)	Controle (µg/ml)	Cafeína (µg/ml)	Caf + N (µg/ml)	Caf + P (µg/ml)	Caf + N + P (µg/ml)
0	0,123±0,078	171,492±55,958	189,671±69,407	202,447±43,679	210,091±7,816
3	0,067±0,005	221,438±19,335	220,534±16,996	220,924±12,527	218,178±1,905
7	0,070±0,005	218,494±28,891	219,736±10,493	0,072±0,005	0,067±0,005
14	0,066±0,002	211,177±10,330	218,813±3,658	0,078±0,012	0,072±0,005
21	0,069±0,003	208,117±7,690	212,812±9,365	0,082±0,035	0,082±0,039

Tabela 1. Média e desvio padrão das concentrações de cafeína por tratamento ao longo do tempo.

3.2 Degradação da cafeína ao longo do tempo:

O tratamento controle apresentou baixas concentrações de cafeína ao longo de todo o experimento. Os tratamentos "Cafeína" e "Cafeína + N" apresentaram valores relativamente constantes em torno de 200 µg/ml ao longo de todo o experimento e, não apresentaram diferenças significativas entre si. Os tratamentos "Cafeína + P" e "Cafeína + N + P" apresentaram comportamento semelhante entre si, apresentando uma rápida degradação da cafeína entre 3 e 7 dias de incubação praticamente zerando a quantidade da substância na amostra, igualando seus valores às concentrações do controle. As concentrações de cafeína dos tratamentos "Cafeína + P" e "Cafeína + N + P" foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) dos tratamentos "Cafeína" e "Cafeína + N" a partir do dia 7 de incubação e, foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) do controle nos dias 0 e 3 (Figura 3).

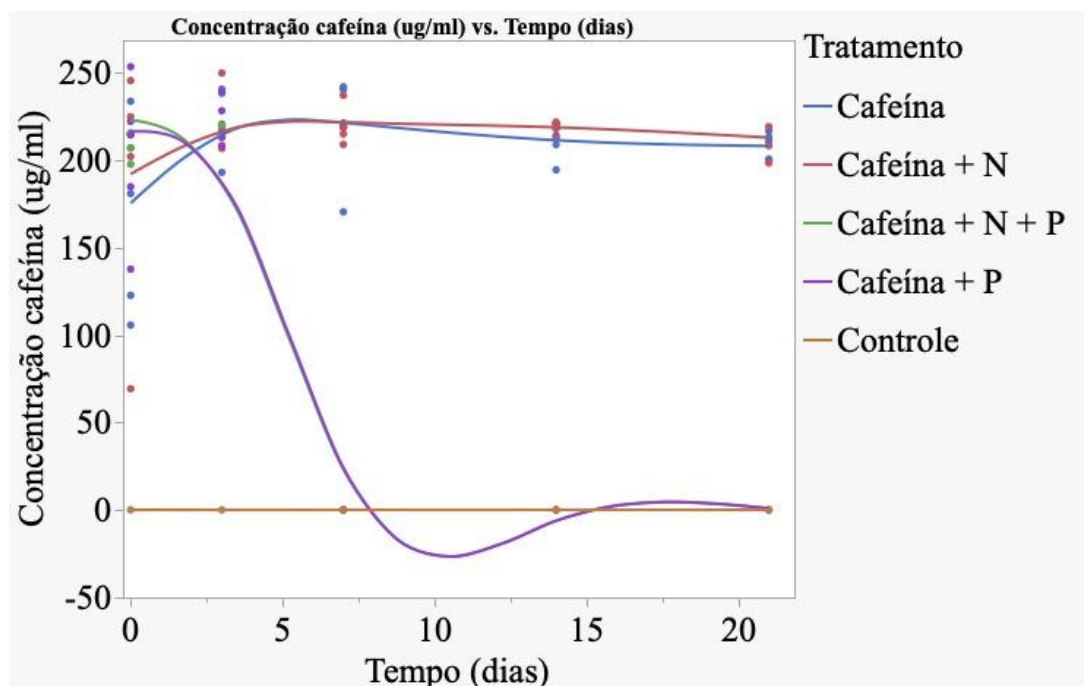


Figura 4. Concentração de cafeína (ug/ml) de cada tratamento ao longo do tempo (dias). As linhas representam as médias e os pontos representam as concentrações de cafeína nas réplicas de cada tratamento.

3.3 Respiração bacteriana:

Réplicas	Controle	Caf	Caf + N	Caf + P	Caf + N + P
1	18,608	13,803	8,714	11,353	13,474
2	9,891	14,815	12,165	10,347	16,400
3	15,722	15,248	9,177	15,862	19,456
4	17,678	17,183	9,483	1,593	16,209

Tabela 2. Taxas de respiração bacteriana em $\mu\text{M}/\text{dia}$.

As taxas de respiração bacteriana variaram de 19,456 no tratamento "Caf + N + P" a 1,593 no tratamento "Caf + P". Foram significativamente menores nos tratamentos "Caf + N" e "Caf + P" que nos demais tratamentos ($p < 0,05$), os quais não diferiram significativamente entre si (Figura 5). Esses resultados apontam que apesar da molécula de cafeína ter degradado rapidamente após a adição de Fósforo como indicado na figura 4, não apontam uma maior atividade bacteriana, uma vez que o

tratamento com N onde não ocorreu a degradação da cafeína, obteve valores semelhantes.

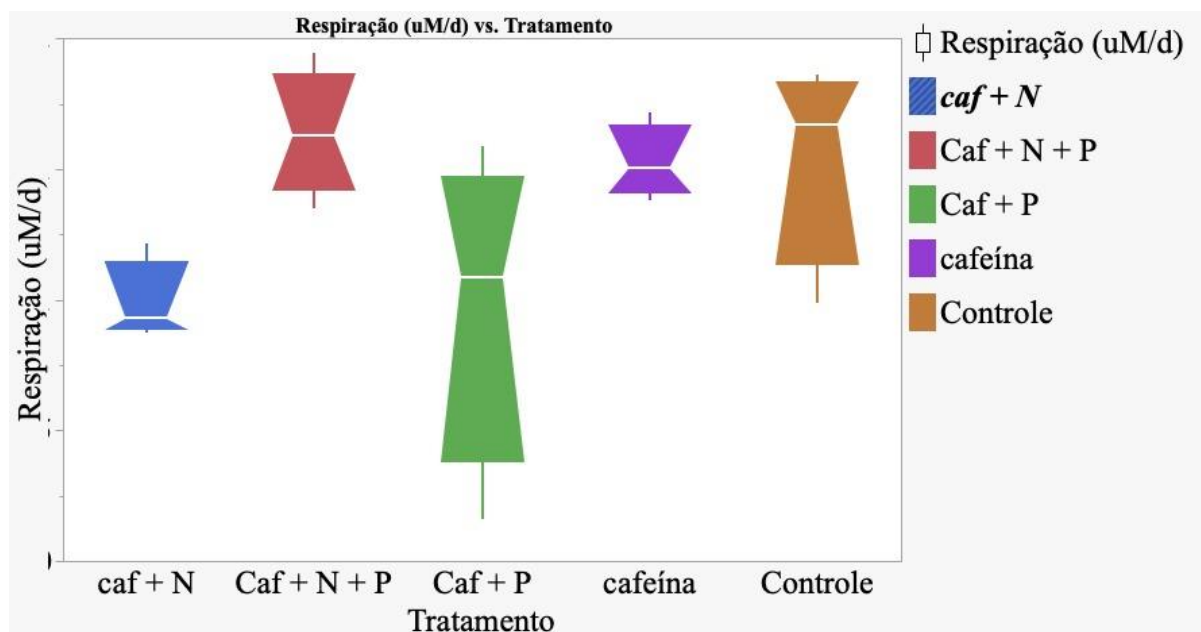


Figura 5. Taxas de respiração bacteriana ($\mu\text{M}/\text{dia}$) por tratamento.

4 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de N e P, separadamente ou em conjunto, afetam a degradação da cafeína. Existem poucos estudos descrevendo a dinâmica da degradação da cafeína no ambiente aquático e a influência dos nutrientes neste processo, por outro lado estudos de biorremediação de ambientes afetados pela atividade antrópica apontam a importância da presença dos nutrientes na atividade bacteriana (Edwards et al., 2013). Considerando o fósforo como percussor do crescimento e aumento da atividade bacteriana e a ausência deste nutriente na molécula da cafeína, esperava-se que a adição de P causasse o aumento na degradação das moléculas de cafeína. Além disso a cafeína pode ser utilizada como fonte de carbono e nitrogênio para o metabolismo bacteriano. Em acordo, nossos resultados mostraram que após 3 dias de incubação, a adição de P, com ou sem a adição combinada de N acelerou o processo de degradação (Figura 4). Em contrapartida, as taxas de respiração não responderam à adição dos nutrientes no mesmo padrão.

Nitrogênio e fósforo são nutrientes abundantes em águas residuais (Rout et al., 2021). A quantidade de N biodisponível aumentou substancialmente na natureza ao longo do tempo (Galloway & Cowling, 2002) e segundo Elser (2009) o aumento da atividade antropogênica tem afetado os padrões de limitações ecológicas dos nutrientes, causando uma mudança na estequiometria de N:P, indicando que a maior deposição de N contribuiu com o aumento da limitação de P nos lagos avaliados. Além disso, fatores como luz, temperatura e o grau de eutrofização

antropogênica também podem colaborar para a alteração da proporção dos nutrientes nos ecossistemas aquáticos (Yan et al., 2016; Kragh 2018).

A distribuição de microrganismos em lagos de água doce é impulsionada principalmente pelo nitrogênio, com valores de abundância mais elevados na zona litoral em comparação com a zona limnética (Wang et al., 2018). Enquanto o fósforo é o principal nutriente limitante para o metabolismo bacteriano, e.g. produção de biomassa bacteriana, em ecossistemas de água doce (Farjalla et al., 2002). Por outro lado, estudos demonstraram a prevalência da co-limitação de nutrientes nos ecossistemas, o que pode potencializar seus efeitos (Howarth 2007; Elser et al., 2007), o que colabora com os resultados obtidos neste trabalho na qual a adição conjunta dos nutrientes não inibiu a resposta do P na degradação da cafeína.

As bactérias em ecossistemas de água doce podem ser extremamente pobres em nutrientes, principalmente o fósforo, sugerindo que podem alternar funções entre retenção de nutrientes e regeneração, dependendo da sua estequiometria de biomassa e estequiometria de recursos (Cortner et al., 2010). Portanto, com a adição de fósforo, as bactérias teriam a possibilidade de ampliar seu metabolismo, aumentando sua biomassa total e suas taxas de mineralização da matéria orgânica, esta última representada pela respiração bacteriana (e.g. Roland & Cole 1999). Por exemplo, a adição de N e P em amostras ambientais na temperatura do experimento realizado, sugere aumento das taxas de respiração bacteriana (Berggren et al. 2010). Contudo, essa adição também exerce efeitos sobre o crescimento bacteriano, que também precisa ser avaliado nesse trabalho.

A estabilidade da molécula de cafeína em águas residuais é um indício de que existem formas químicas mais disponíveis como fonte de energia para as bactérias aquáticas, reduzindo a degradação de moléculas mais complexas, como a cafeína. Após os resultados obtidos foi possível notar que ao adicionar fósforo nas amostras, a cafeína é rapidamente degradada. Em contrapartida, as taxas de respiração encontradas não indicaram um aumento no metabolismo bacteriano no tratamento com adição de fósforo, e sim mostraram valores que foram semelhantes ao com adição de nitrogênio. Esses resultados apontam que é provável que a inclusão de fósforo tenha mitigado as restrições das bactérias em relação a esse elemento, possibilitando assim a utilização da cafeína como fonte de energia e matéria na presença do fósforo. Para compreender melhor a dinâmica das bactérias na degradação da cafeína com adição de nutrientes, é necessário conduzir um estudo da formação de biomassa bacteriana durante o experimento, uma vez que as taxas de respiração não atingiram valores esperados. Para isso será analisada a densidade bacteriana de amostras previamente coletadas.

5 CONCLUSÃO

Na era do Antropoceno, a urbanização, industrialização e a crescente demanda por recursos naturais têm contribuído para a degradação dos corpos d'água, resultando em problemas como a poluição, eutrofização, acidificação e perda da biodiversidade aquática. Além disso, a introdução de contaminantes emergentes na água cujos efeitos a longo prazo ainda não são completamente compreendidos, tornando-se um desafio cada vez maior na conservação destes

ambientes. As concentrações de cafeína encontradas na água têm se tornado uma preocupação crescente devido aos seus potenciais riscos. Compreender a dinâmica que existe no processo de degradação dessa substância por bactérias nos ambientes aquáticos se faz necessário, uma vez que a redução deste contaminante desempenha um papel importante na preservação da qualidade da água e no equilíbrio ecossistêmico.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho concluímos que a adição do Fósforo, isolada ou em conjunto com Nitrogênio, estimulou a rápida degradação da cafeína. Este trabalho poderá contribuir para estudos acerca da degradação da cafeína, bem como no que se refere à mitigação dos impactos dessa substância, uma vez que ao reconhecer a influência de nutrientes específicos na dinâmica de degradação, abre-se espaço para estratégias mais direcionadas na gestão e conservação dos recursos hídricos.

REFERÊNCIAS

- BERGGREN, M.; LAUDON, H.; JONSSON, A.; JANSSON, M. Nutrient constraints on metabolism affect the temperature regulation of aquatic bacterial growth efficiency. *Microb Ecol*, v. 60, n. 4, p. 894-902, Nov 2010. DOI: 10.1007/s00248-010-9751-1. PMID: 20878521.
- BRADLEY, P. M.; BARBER, L. B.; KOLPIN, D. W.; MCMAHON, P. B.; CHAPELLE, F. H. Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as wastewater indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 6, p. 1116-1121, 2007. DOI: 10.1897/06-483r.1.
- BRIAND, E., PRINGAULT, O., JACQUET, S., & TORRÉTON, J. P. (2004). The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2, 406-416. DOI: 10.4319/lom.2004.2.406.
- CANELA, Maria; JARDIM, Wilson; SODRÉ, Fernando; GRASSI, Marco. Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil. DOI: 10.13140/2.1.3543.3289.
- CERVENY, D.; CISAR, P.; BRODIN, T. et al. Environmentally relevant concentration of caffeine—effect on activity and circadian rhythm in wild perch. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, p. 54264–54272, 2022. DOI: 10.1007/s11356-022-19583-3.
- CHRISTOFI, N., & IVSHINA, I. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01774.x>.
- COTNER, J., HALL, E., SCOTT, J., & HELDAL, M. (2010). Freshwater Bacteria are Stoichiometrically Flexible with a Nutrient Composition Similar to Seston. *Frontiers in Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00132>.
- DASH, S. S.; GUMMADI, S. N. Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnol Lett*, v. 28, p. 1993–2002, 2006. DOI: 10.1007/s10529-006-9196-2.
- DIAMOND, J.; LATIMER, H.; MUNKITTRICK, K.; THORNTON, K.; BARTELL, S.; KIDD, K. Prioritizing contaminants of emerging concern for ecological screening assessments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, 2011. DOI: 10.1002/etc.667.
- DOS SANTOS, J. A. et al. Sublethal effects of environmental concentrations of caffeine on a neotropical freshwater fish. *Ecotoxicology*, v. 31, p. 161–167, 2022. DOI: 10.1007/s10646-021-02498-z.
- ELSER, J., FEE, E., GUILDFORD, S., STERNER, R., & CHRZANOWSKI, T. (1997). The Light: Nutrient Ratio in Lakes: The Balance of Energy and Materials Affects Ecosystem Structure and Process. *The American Naturalist*, 150, 663 - 684. <https://doi.org/10.1086/286088>.

FANROUSSI, S., & AGATHOS, S. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 268-75. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2005.04.011>.

FARJALLA, V. F. et al. Nutrient limitation of bacterial production in clear water Amazonian ecosystems. *Hydrobiologia*, v. 489, p. 197–205, 2002. DOI: 10.1023/A:1023288922394.

GOGOI, A. et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, v. 6, p. 169-180, 2018. DOI: 10.1016/j.gsd.2017.12.009.

GUPTA, A., GUPTA, R., SINGH, R.L. (2017). Microbes and Environment. In: SINGH, R. (eds) *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1866-4_3.

IBRAHIM, S. et al. Characterisation and growth kinetics studies of caffeine-degrading bacterium *Leifsonia* sp. strain SIU. *Ann Microbiol*, v. 66, p. 289–298, 2016. DOI: 10.1007/s13213-015-1108-z.

ISLES, P., CREED, I., & BERGSTRÖM, A. (2018). Recent Synchronous Declines in DIN:TP in Swedish Lakes. *Global Biogeochemical Cycles*, 32, 208 - 225. <https://doi.org/10.1002/2017GB005722>.

JAMES J. ELSER ET AL. Shifts in Lake N:P Stoichiometry and Nutrient Limitation Driven by Atmospheric Nitrogen Deposition. *Science* 326, 835-837 (2009). DOI:10.1126/science.1176199

JANINA S.G. DIOGO, LILIANA S.O. SILVA, ANGELINA PENA, CELESTE M. LINO. Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: A 2010 survey. *Food and Chemical Toxicology*, v. 62, 2013, p. 548-553. DOI: 10.1016/j.fct.2013.09.006.

JUAN G. BELTRÁN, RICHARD L. LEASK, WAYNE A. BROWN. Activity and stability of caffeine demethylases found in *Pseudomonas putida* IF-3. *Biochemical Engineering Journal*, v. 31, n. 1, 2006, p. 8-13. DOI: 10.1016/j.bej.2006.05.006.

KIM, S. D., CHO, J., KIM, I. S., VANDERFORD, B. J., & SNYDER, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 41(5), 1013-1021. DOI: 10.1016/j.watres.2006.06.034. PMID: 16934312.

KRAGH, T., SØNDERGAARD, M., & TRANVIK, L. (2008). Effect of exposure to sunlight and phosphorus-limitation on bacterial degradation of coloured dissolved organic matter (CDOM) in freshwater. *FEMS microbiology ecology*, 64(2), 230-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00449.x>.

LABBATE, M. et al. Editorial: Anthropogenic Impacts on the Microbial Ecology and Function of Aquatic Environments. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01044.

LE MOAL, M. et al. Eutrophication: A new wine in an old bottle? *Science of The Total Environment*, v. 651, p. 1–11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.139>.

MADHAV, S. et al. Water Pollutants: Sources and Impact on the Environment and Human Health. In: POOJA, D. et al. (eds.) *Sensors in Water Pollutants Monitoring: Role of Material. Advanced Functional Materials and Sensors*. Springer, Singapore, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-0671-0_4.

MARASCO JÚNIOR, C. A.; LUCHIARI, N. da C.; LIMA GOMES, P. C. F. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. *Eclética Química*, v. 44, n. 4, p. 11–26, 2019. DOI: 10.26850/1678-4618eqj.v44.4.2019.p11-26.

MARSHALL, K. (1980). Microorganisms and Interfaces. *BioScience*, 30, 246-249. <https://doi.org/10.2307/1307879>.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. 2017. (Inserir o título da conferência ou evento, se aplicável).

MOORE, M. T., GREENWAY, S. L., FARRIS, J. L., & GUERRA, B. (2008). Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(1), 31-35. DOI: 10.1007/s00244-007-9059-4.

MORIN-CRINI, N. et al. Removal of emerging contaminants from wastewater using advanced treatments. A review. *Environ Chem Lett*, v. 20, p. 1333–1375, 2022. DOI: 10.1007/s10311-021-01379-5.

OGUNSEITAN OA. Removal of caffeine in sewage by *Pseudomonas putida*: Implications for water pollution index. *World J Microbiol Biotechnol*, 1996 May;12(3):251-6. DOI: 10.1007/BF00360923.

PAERL, H., & OTTEN, T. (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, 65, 995-1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>.

QUADRA, G. R.; PARANAÍBA, J. R.; VILAS-BOAS, J.; ROLAND, F.; AMADO, A. M.; BARROS, N.; DIAS, R. J. P.; CARDOSO, S. J. A global trend of caffeine consumption over time and related-environmental impacts. *Environmental Pollution*, v. 256, p. 113343, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113343>. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31672373.

ROLAND, Fábio; COLE, Jonathan. Regulation of bacterial growth efficiency in a large turbid estuary. *Aquatic Microbial Ecology - AQUAT MICROB ECOL*, v. 20, p. 31-38, 1999. DOI: 10.3354/ame020031.

ROUT, P. et al. Nutrient removal from domestic wastewater: A comprehensive review on conventional and advanced technologies. *Journal of Environmental Management*, v. 296, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113246.

SODRÉ, F.F., LOCATELLI, M.A.F. & JARDIM, W.F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. *Water Air Soil Pollut*, 206, 57–67 (2010). DOI: 10.1007/s11270-009-0086-9.

SUMMERS, R. M., SEFFERNICK, J. L., QUANDT, E. M., YU, C. L., BARRICK, J. E., & SUBRAMANIAN, M. V. (2013). Caffeine junkie: an unprecedented glutathione S-transferase-dependent oxygenase required for caffeine degradation by *Pseudomonas putida* CBB5. *Journal of Bacteriology*, 195(17), 3933-3939. DOI: 10.1128/JB.00585-13.

TRAN, N. H.; REINHARD, M.; GIN, K. Y.-H. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, v. 133, p. 182-207, 2018. DOI: 10.1016/j.watres.2017.12.029.

VIEIRA, L. R.; SOARES, A. M.; FREITAS, R. Caffeine as a contaminant of concern: A review on concentrations and impacts in marine coastal systems. *Chemosphere*, v. 286 Pt 2, p. 131675, 2021.

WANG, W., LIU, W., WU, D., WANG, X., & ZHU, G. (2018). Differentiation of nitrogen and microbial community in the littoral and limnetic sediments of a large shallow eutrophic lake (Chaohu Lake, China). *Journal of Soils and Sediments*, 19, 1005-1016. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2090-4>.

YAN, Z., HAN, W., PEÑUELAS, J., SARDANS, J., ELSER, J.J., DU, E., REICH, P.B., and FANG, J. (2016). Phosphorus accumulates faster than nitrogen globally in freshwater ecosystems under anthropogenic impacts. *Ecol Lett*, 19, 1237-1246. <https://doi.org/10.1111/ele.12658>.

ZHOU, A., TAYLOR, A. E., KARHUNEN, V., et al. (2018). Habitual coffee consumption and cognitive function: a Mendelian randomization meta-analysis in up to 415,530 participants. *Scientific Reports*, 8(1), 7526. DOI: [10.1038/s41598-018-25919-2](<https://doi.org/10.1038/s41598>