

II-046 - AVALIAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA DIPIRONA E SEUS EFEITOS TOXICOLÓGICOS EM SISTEMAS ANAERÓBIOS SIMPLIFICADOS

Raquel Vieira Busto⁽¹⁾

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

Lúcia Helena Gomes Coelho⁽¹⁾

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

Endereço⁽¹⁾: Av. dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha, Santo André - SP - CEP: 09210-580 - Brasil - Tel: (11) 4996-8206, e-mail: raquel.busto@aluno.ufabc.edu.br

RESUMO

Diversos estudos sobre a ocorrência de fármacos no meio ambiente têm indicado o esgoto como a principal rota pela qual esses compostos chegam às águas superficiais, uma vez que, mesmo após tratamento biológico, muitos destes e de seus subprodutos não sofrem degradação. Seus efeitos adversos ao ecossistema aquático e à população mostram que é necessário monitorar e avaliar sua persistência no meio ambiente. No corpo humano, a dipirona é rapidamente hidrolisada para o composto 4-metilaminoantipirina (4-MAA), o qual se transforma em outros compostos recalcitrantes. Com isto, este trabalho avaliou o efeito da adição de dipirona em tratamento anaeróbio de um efluente sintético simulando as condições de efluente primário em um sistema simplificado empregando seringas de vidro de 100 mL para avaliação de subprodutos e seus efeitos toxicológicos. A adição do fármaco nas concentrações de 250 a 25000 µg L⁻¹ causou inibição na produção de biogás a partir do sexto dia de experimento. Ao final de 48 dias de tratamento, a biodegradabilidade média foi reduzida de 64,4 % no sistema controle para 45,6 % na presença de fármacos. A análise por LC-HRMS mostrou a presença dos subprodutos 4-MAA, 4-AA, 4-AAA, oxamazida (C₁₂H₁₆N₃O₃), 1-metil-2-fenilacetohidrazina (C₉H₁₂N₂O) e dois compostos de fórmula molecular C₁₁H₁₃N₂O₃ e C₉H₁₂N₂O, cujas concentrações foram estimadas com base na curva de calibração obtida para a dipirona. Através da análise estatística utilizando ANOVA (Teste Tukey), verificou-se que a espécie *Lactuca sativa* não é sensível à presença do composto 4-MAA e seus subprodutos de degradação, antes ou após o tratamento, enquanto que a amostra tratada contendo concentração inicial de dipirona de 25000 µg L⁻¹ causou inibição à espécie *Aliivibrio fischeri* de 23,1 % após do tratamento. A espécie *Raphidocelis subcapitata*, por outro lado, apresentou sensibilidade para as amostras antes tratamento, com inibições de até 56,3 %, enquanto que o efluente tratado na presença de fármaco estimulou a alga em até duas vezes em relação ao controle, demonstrando a importância de se utilizar organismos de diversos níveis tróficos neste tipo de avaliação.

PALAVRAS-CHAVE: Dipirona, degradação anaeróbia, ecotoxicologia.

INTRODUÇÃO

No ano de 2014, a Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos no Brasil (PNAUM, 2014), com o objetivo de avaliar o acesso, a utilização e o uso racional de remédios por parte da população brasileira, gerou uma lista com os principais fármacos utilizados no território nacional. Dentre estes fármacos, destaca-se a dipirona, principalmente utilizada como analgésico e antipirético pelos pacientes. No corpo humano, a dipirona é rapidamente hidrolisada para o composto 4-metilaminoantipirina (4-MAA), o qual é em seguida metabolizado para os compostos 4-formilaminoantipirina (4-FAA) e 4-aminoantipirina (4-AA), sendo este último acetilado para o produto 4-acetilaminoantipirina (4-AAA). Aproximadamente 60 % da dose de dipirona administrada é excretada através da urina na forma dos quatro metabólitos anteriormente citados (ERGÜN et al., 2004).

Desta maneira, a principal rota de introdução destes metabólitos no meio ambiente se dá através do esgoto, chegando às estações de tratamento de efluentes em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (ROSAL et al. 2010; KLAMERTH et al., 2013). Estes metabólitos podem ser liberados no meio ambiente através de efluentes não tratados despejados diretamente em cursos d'água ou que não são removidos completamente durante o tratamento de esgotos convencional, sendo, por muitas vezes, despejados em águas superficiais (ROSAL et al. 2010).

Considerando-se que os estudos de avaliação e monitoramento de micropoluentes em matrizes ambientais, assim como as tecnologias para a remoção desses compostos em Estações de Tratamento de Esgotos, ainda são bastante incipientes no Brasil, a presença destes compostos no meio ambiente é de grande preocupação. Pequenas concentrações dos metabólitos têm sido associadas a efeitos toxicológicos agudos e crônicos em organismos aquáticos (GOMÉZ et al., 2008; PAMPLONA et al., 2011), podendo levar a desequilíbrios na biodiversidade. Com isso, esse trabalho visou avaliar a biodegradabilidade e os subprodutos de degradação do fármaco dipirona sob condições anaeróbias empregando-se um sistema simples baseado em seringas de vidro, avaliando-se também a ecotoxicidade do efluente tratado.

OBJETIVO

Avaliar os subprodutos de degradação do analgésico dipirona e seus efeitos toxicológicos em um sistema de tratamento anaeróbio simplificado, baseado em seringas de vidro.

METODOLOGIA

Preparo de Efluente Sintético

O efluente sintético, baseado no trabalho de Souza (2011), foi empregado afim de simular os parâmetros físico-químicos comumente encontrados em sistemas de tratamento primário, conforme Tabela 1 abaixo.

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

Classificação do composto	Composição	Concentração (mgL^{-1})
Carboidratos (40% DQO)	Sacarose	56
	Celulose	54,4
Proteínas (50% DQO)	Extrato de carne	332,8
Lipídeos (10% DQO)	Óleo de soja	81,6
Emulsificante	Detergente	(5 gotas L^{-1})
Tampão	NaHCO_3	320
	NaCl	250
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,5
	NH_4Cl	153,0
	KH_2PO_4	36
	EDTA	30
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,5
	H_3BO_3	0,45
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,09
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,36
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,18
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,36
	KI	0,54
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,45
Sais e micronutrientes		

Avaliação da Biodegradabilidade dos Compostos Estudados (Teste da Seringa)

O sistema consistiu em seringas de 100 mL de vidro às quais foram adicionados o efluente contendo os compostos de interesse (efluente sintético) e o lodo digerido (inóculo). Cada seringa foi preenchida com uma razão final mmol carbono orgânico/ g sólidos voláteis igual a 0,2, em um volume final de 33 mL. Para tanto, o efluente sintético foi preparado concentrado em 10 vezes a receita original, gerando uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 9200 mg O₂ L⁻¹. Três níveis de concentração diferentes (250, 2500 e 25000 µg L⁻¹) de dipirona foram avaliados nos testes, os quais foram empregados em concentração dez vezes maior (como observado para a DQO). Um controle com polietilenoglicol (7 g L⁻¹) foi realizado a fim de se validar o experimento (o experimento é considerado válido se o controle atingir valor de biodegradação igual ou superior a 60 %). Ao final, nitrogênio foi borbulhado à mistura para obtenção de condições anaeróbias e a seringa, selada com o êmbolo e levada a uma incubadora a 35 °C sob as condições estipuladas. O biogás gerado no processo foi medido através da movimentação do êmbolo, sendo o volume correspondente à taxa de biodegradação do efluente na presença de dipirona (ISO 11734:1995). O teste durou 48 dias, quando então as seringas foram abertas para realização das análises por cromatografia e ecotoxicológicas.

Análise por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (LC-HRMS)

Foi empregado um equipamento Q Exactive Orbitrap (ThermoScientific) e coluna Accucore C₁₈ LC (100 x 2,1 mm, tamanho de partícula 3 µm) acondicionada a 30 °C (Waters). Foi utilizado espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (EIS) operando em modo positivo com voltagem de +3.5 kV e temperatura da fonte de ionização igual a 300 °C. O scan foi realizado na faixa m/z = 150 – 1500 com resolução de 17500. A janela de isolamento para o produto iônico foi de 2.0 m/z com energia de colisão normalizada de 35 eV.A. A fase móvel, operando com fluxo de 0,2 mL min⁻¹, foi composta de metanol (eluente A) e 0,1 % de ácido fórmico em água (eluente B), conforme gradiente indicado na Tabela 2:

Tabela 2: Gradiente multifásico utilizado durante a análise por LC-HRMS.

Tempo (min)	Fase A	Fase B
0-2	1 %	99 %
2-5	1 – 30 %	99 – 70 %
5-8	30 %	70 %
8-12	30 – 99 %	70 – 1 %
12-18	99 %	1 %
18-19	99 – 1 %	1 – 99 %
19-28	1 %	99 %

Análises Ecotoxicológicas

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

Alga Raphidocelis subcapta: Os testes foram conduzidos de acordo com a OECD, Teste número 201 (OECD, 2011). Três dias antes do início do teste, a cultura contendo cerca de 10⁷ células mL⁻¹ de algas foi preparada em meio Jaworski. A concentração inicial de células em cada teste foi de 10⁶ células mL⁻¹ e os testes realizados em quadruplicatas para reduzir o desvio-padrão. Durante os testes, as amostras foram mantidas durante agitação constante (120 rpm) para manter as algas em suspensão e facilitar a transferência de CO₂. A temperatura foi mantida em 21 °C e a intensidade de luz em 3500 lux. As medidas foram realizadas após 96 h do início do experimento. As células foram contadas usando um microscópio (Brunel Microscopes, Model N-300M) e um contador de células (Celeromics).

Bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*: Os testes foram conduzidos de acordo com a ISO 11348-3:2007. Antes das análises, as amostras foram diluídas (1:9) com solução de NaCl para obtenção de um meio com salinidade 2 % (m/v). A substância de referência, dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), foi preparada pela adição de 0,653 g de K₂Cr₂O₇ em 100 mL de água deionizada e desta solução, uma diluição 1:100 usando solução de NaCl a 2% (m/v). A solução denominada *ISO Test Water* (OECD) foi utilizada como controle positivo. A solução contendo a bactéria marinha foi preparada pela adição de 11 mL da solução diluente ("BioFix Lumi Medium for

freeze-dried luminiscent bacteria”) no vial contendo a bactéria liofilizada (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Para realizar os testes, vials foram inseridos em uma incubadora a 15 °C. 100 µL da suspensão de bactérias foram adicionados a cada vial e após 15 min, realizou-se a leitura inicial (I_0) utilizando-se de um luminômetro portátil (BioFix Lumi-10, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Um volume de 900 µL de cada amostra foi adicionado aos vials com intervalo de 30 s entre amostras. Após 30 min da leitura do primeiro vial, novas leituras foram realizadas em intervalos de 30 s (I_{30}). O “valor gama” (Ht) foi calculado utilizando-se a expressão:

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

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados do efeito da adição de dipirona sobre a biodegradabilidade e a produção de biogás em função da concentração de fármaco utilizada. O experimento foi considerado válido uma vez que o sistema com polietilenoglicol atingiu biodegradação de 70 ± 3 % após 17 dias. A análise estatística usando ANOVA ($p < 0,05$) mostrou que as concentrações de 25000 a 250000 µg L⁻¹ causaram inibições na biodegradabilidade do efluente a partir do sexto dia de tratamento, enquanto que a adição inicial de 2500 µg L⁻¹ causou reduções em relação ao branco a partir do nono dia. Ao final dos 48 dias de incubação sob condições anaeróbias, todos os sistemas nos quais a dipirona foi adicionada resultaram em biodegradabilidades similares, com valor médio de 45,6 %, enquanto que o tratamento do efluente sem adição de fármaco resultou em biodegradabilidade média de (64.4 ± 5.9) %. A produção de biogás acumulada acompanhou os resultados observados para biodegradabilidade.

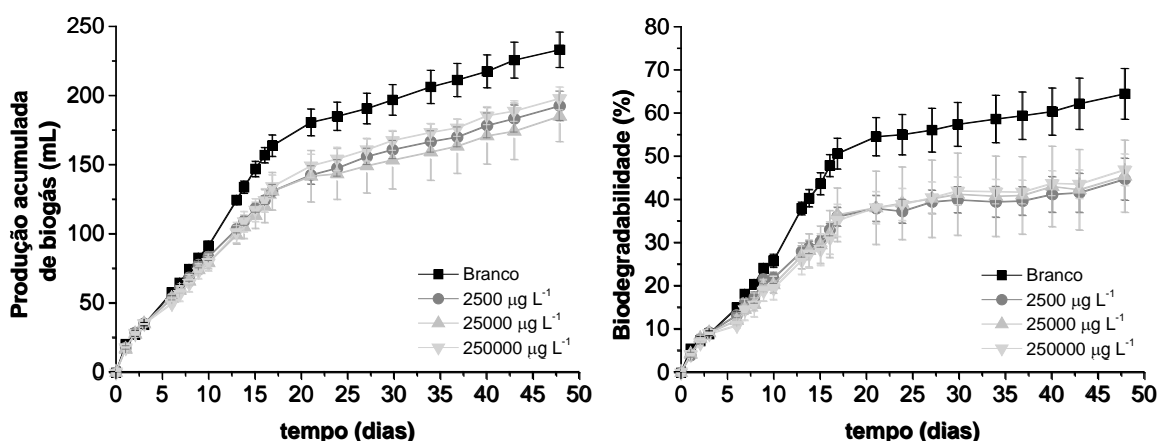


Figura 1: Estudo de biodegradabilidade de dipirona de acordo com a concentração inicial de dipirona.

Ao final dos 48 dias de tratamento sob condições anaeróbias, foi realizada a análise por LCMS, a qual permitiu a identificação dos subprodutos 4-MAA, 4-AA e 4-AAA, além de mais quatro compostos, incluindo uma oxamazida (C₁₂H₁₆N₃O₃, SPD1), obtida da abertura do anel pirazolinona, e o respectivo produto de hidrólise 1-metil-2-fenilacetohidrazina (C₉H₁₂N₂O, SPD3) e dois compostos de fórmula molecular C₁₁H₁₃N₂O₃ (SPD2) e C₉H₁₂N₂O (SPD4), cujas estruturas são mostradas na Figura 2. O composto 4-FAA não foi detectado durante

as análises. Todos os subprodutos foram quantificados com base na curva de calibração obtida para a dipirona e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

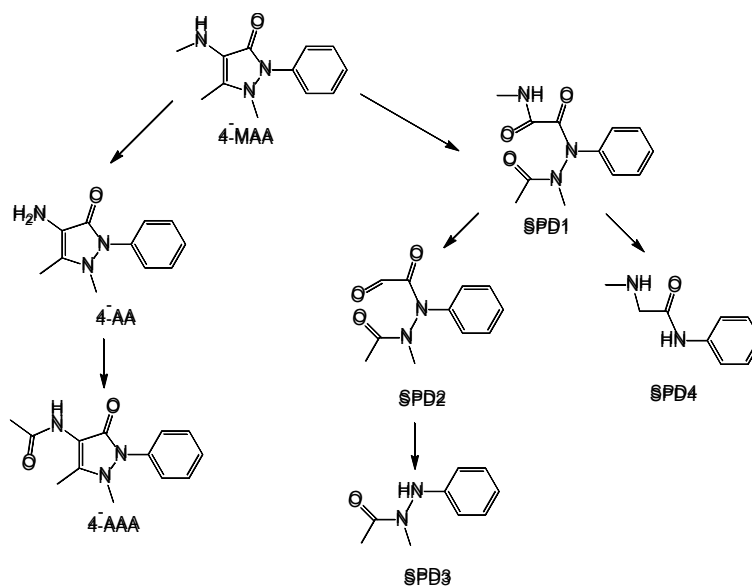


Figura 2: Subprodutos de degradação da dipirona observados nos experimentos.

Tabela 2: Concentração dos subprodutos obtidos da degradação de dipirona sob condições anaeróbias após tratamento de 48 dias.

Dipirona adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Composto	Concentração Inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração Final ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% remoção	Δ formação ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2500	4-MAA	2444	1288 ± 59	$47,3 \pm 2,4$	-
	4-AA	0	0	-	-
	4-AAA	0	22 ± 2	-	22
	SPD1	141	20 ± 6	$85,8 \pm 4,1$	-
	SPD2	15	9 ± 2	$36,6 \pm 10,9$	-
	SPD3	25	5 ± 1	$81,7 \pm 3,9$	-
	SPD4	12	26 ± 3	-	14
25000	4-MAA	26076	8846 ± 205	$66,1 \pm 0,8$	-
	4-AA	316	1 ± 2	$99,7 \pm 0,6$	-
	4-AAA	298	188 ± 13	$36,8 \pm 4,5$	-
	SPD1	1584	348 ± 27	$78,0 \pm 1,7$	-
	SPD2	34	84 ± 18	-	50
	SPD3	190	41 ± 2	$78,6 \pm 1,2$	-
	SPD4	43	284 ± 25	-	241
250000	4-MAA	235792	45485 ± 1639	$80,7 \pm 0,7$	-
	4-AA	3809	17 ± 2	$99,6 \pm 0,1$	-
	4-AAA	7139	1761 ± 87	$75,3 \pm 1,2$	-
	SPD1	17589	4754 ± 75	$73,0 \pm 0,4$	-
	SPD2	256	540 ± 14	-	284
	SPD3	3156	380 ± 14	$88,0 \pm 0,6$	-
	SPD4	669	2351 ± 237	-	1682

A análise por LC-HRMS mostrou elevadas concentrações do composto 4-MAA antes do tratamento anaeróbio, como esperado, com taxas de degradação variando entre $(47,3 \pm 2,4) \%$ e $(80,7 \pm 0,7) \%$, o que indica sua persistência ao tratamento anaeróbio, mesmo após 48 dias de ensaio. Para os demais produtos nos quais se verificou remoção do sistema, as taxas se mantiveram entre $(73,0 \pm 0,4) \%$ e $(99,7 \pm 0,6) \%$, com exceção do composto 4-AAA no sistema com concentração inicial de dipirona igual a $25000 \mu\text{g L}^{-1}$, no qual a taxa de remoção foi de apenas $36,8 \pm 4,5 \%$. Observou-se formação dos subprodutos SPD2 e SPD4, inicialmente presentes no sistema, com exceção do produto SPD2 no sistema contendo concentração inicial de dipirona de $2500 \mu\text{g L}^{-1}$, no qual houve baixa remoção do mesmo, de apenas $(36,6 \pm 10,9) \%$.

Na segunda etapa deste trabalho, executaram-se os testes ecotoxicológicos com diversos tipos de organismos. A Figura 3 apresenta os dados para o Teste de Germinação de Sementes e Crescimento Radicular, enquanto que as Figuras 4 e 5 apresentam os resultados para as análises com *Aliivibrio fischeri* e *Raphidocelis subcapitata*, respectivamente.

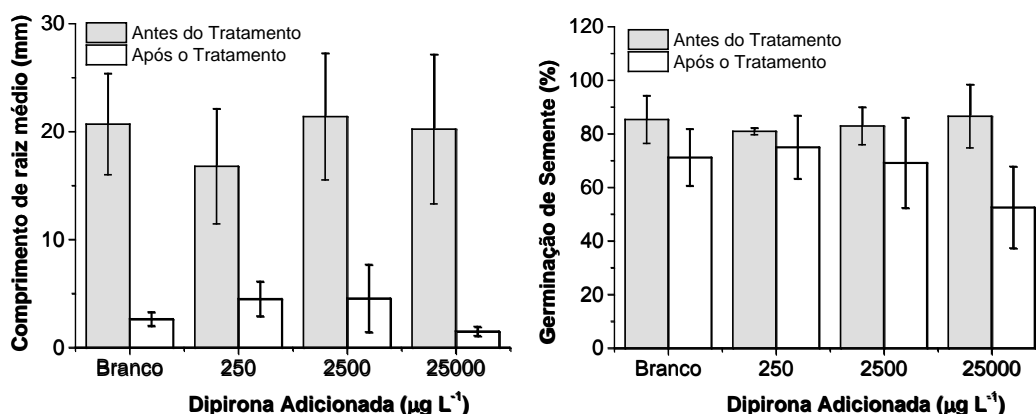


Figura 3: Resultados obtidos para o teste de Germinação de Sementes e Crescimento Radicular, antes e após 48 dias de tratamento.

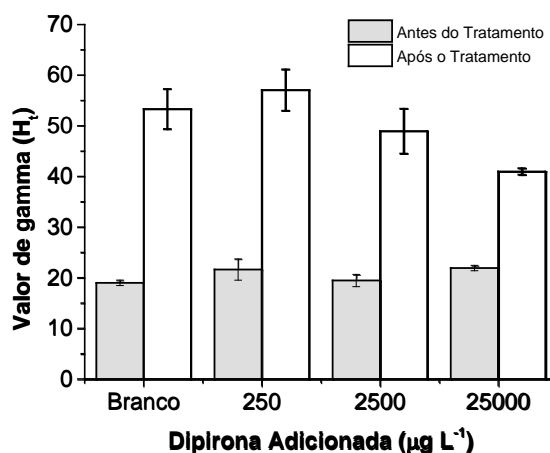


Figura 4: Resultados obtidos para o teste com a espécie *Aliivibrio fischeri* (30 min de exposição), antes e após 48 dias de tratamento.

De acordo com a análise estatística utilizando ANOVA (Teste Tukey), a espécie *Lactuca sativa* não é sensível à presença do composto 4-MAA ou dos demais subprodutos obtidos de sua degradação, antes ou após o tratamento ($p < 0,05$), assim como a presença destes compostos não demonstrou causar efeitos tóxicos à espécie *Aliivibrio fischeri* antes do tratamento. Após o tratamento anaeróbio, no entanto, a adição inicial de $25000 \mu\text{g L}^{-1}$ de dipirona causou efeito tóxico à bactéria marinha neste sistema em relação àquele sem a adição de fármaco (branco) de $23,1 \%$ e em relação ao sistema com concentração inicial de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de dipirona (inibição de $28,2 \%$).

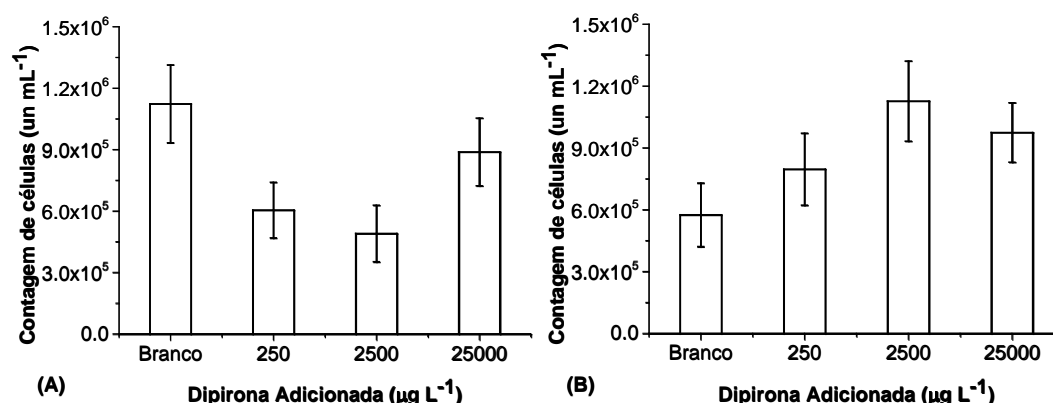


Figura 5: Resultados obtidos para o teste com a espécie *Raphidocelis subcapitata* (96 h), antes (A) e após 48 dias (B) de tratamento.

A espécie *Raphidocelis subcapitata* apresentou ser sensível à presença inicial de 4-MAA (e demais subprodutos presentes no início do tratamento). Interessantemente, a análise estatística para $p < 0,05$ demonstrou que as amostras com concentrações de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$, antes do tratamento, são mais tóxicas do que as amostras do branco (controle, sem fármaco) e do que aquela contendo 250000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de dipirona, com inibições de até 56,3 %; estas duas últimas, por sua vez, apresentaram toxicidade semelhante para $p < 0,05$. Após o tratamento, aumentos sucessivos na concentração de subprodutos apresentaram causar uma redução na toxicidade até a concentração máxima de 250000 $\mu\text{g L}^{-1}$, cuja toxicidade demonstrou ser semelhante à dos sistemas 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($p = 0,144$ e $p = 0,256$, respectivamente).

CONCLUSÕES

A rápida hidrólise de dipirona em meio aquoso levou à formação de diversos subprodutos, em especial o composto 4-MAA. Alguns destes compostos, entretanto, demonstraram apresentar resistência ao tratamento anaeróbio, com taxas de degradação variando de $36,6 \pm 10,9$ a $99,7 \pm 0,6$, mesmo após 48 dias de ensaio. Com relação às análises ecotoxicológicas, a semente de alface (espécie *Lactuca sativa*) não apresentou sensibilidade aos compostos, mesmo quando presentes em elevadas concentrações. Por outro lado, elevadas quantidades de dipirona adicionada no início do experimento levaram a um aumento na toxicidade do efluente tratado para a espécie *Aliivibrio fischeri*, enquanto que a espécie *Raphidocelis subcapitata* foi estimulada com amostras obtidas ao final do tratamento. Estes resultados indicam a importância de se realizar análises ecotoxicológicas utilizando organismos de diferentes níveis tróficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTOLDI, A.D. et al. Use of generic medicines by the Brazilian population: an evaluation of PNAUM 2014. Rev Saúde Pública, v. 50, s. 2, p. 1-11s, 2016.
- GÓMEZ, María J. et al. Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products. Water Research, v. 42, n. 10-11, p. 2698-2706, mai. 2008.
- ERGÜN, H., FRATTARELLI, D.A.C., ARANDA, J.V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 35, p. 479-487, mai. 2004.
- ISO 11348-3:2007. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- ISO 11734:1995. Water quality — Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.
- KLAMERTH, N. et al. Photo-Fenton and modified photo-Fenton at neutral pH for the treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluents: A comparison. Water Research, v. 47, n. 2, p. 833-840, fev. 2013.
- OECD, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Publishing, Paris, 2011.

8. PAMPLONA, J. H. et al. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 74, n. 3, p. 342-349, mar. 2011.
9. ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation, *Water Research*, v. 44, n. 2, p. 578-588, jan. 2010.
10. SOUZA, T. S. O. Desnitrificação autotrófica usando sulfeto como doador de elétrons para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbicos utilizados no tratamento de esgotos sanitários. São Paulo, 2011. Tese de Doutorado - Escola de Engenharia de São Carlos da USP.