



I-077 - AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS PARACETAMOL, CEFALEXINA, DICLOFENACO DE SÓDIO POR BACTÉRIAS PRESENTES EM FILTROS BIOLÓGICOS DE CARVÃO

Alessandro Minillo⁽¹⁾

Oceanólogo e Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) - Jovem Pesquisador FAPESP vinculado ao Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP

Gustavo Adolfo Gonzaga Xavier

Acadêmica do curso de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP de Ilha Solteira

William Deodato Isique

Biólogo pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP de São Jose do Rio Preto. Mestre em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara. Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química de São Carlos – USP de São Carlos.

Edson Pereira Tangerino

Engenheiro Civil pela Escola de Engenharia de Lins (EEL), SP - Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS – Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) – Professor do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP

Endereço⁽¹⁾: Alameda Bahia, 550 – DEC – FEIS – UNESP - Centro – Ilha Solteira - SP - CEP: 15385-000 - Brasil - Tel: (18) 3743 1137 - e-mail: alminillo@yahoo.com.br

RESUMO

O aumento na presença de compostos farmacológicos nos mananciais de abastecimento representa um desafio aos operadores das Estações de Tratamento de Água (ETAs) em razão de sua difícil remoção no tratamento convencional. Entretanto uma série de estudos reportam sobre a suscetibilidade destes compostos xenobióticos a degradação por bactérias presentes na água, sedimento e efluentes de esgoto. Considerando estes aspectos, o presente trabalho avaliou a biodegradação de três fármacos por meio de bactérias presentes em filtros de carvão com atividade biológica (CAB) em sistema “batch”. Para tanto, foi utilizada uma água de estudo contendo três fármacos (cefalexina - 0,015 µg/mL; diclofenaco - 0,30 µg/mL; e paracetamol - 0,20 µg/mL), acrescido de um inóculo do efluente dos filtros CAB. O controle foi representado pelas mesmas condições descritas anteriormente, mas sem receber o inóculo. Os ensaios foram realizados em duplicata, no escuro, com agitação, durante 77 dias, sendo retiradas amostras semanais para análises dos fármacos. Os resultados demonstraram que os fármacos foram biodegradados por bactérias presentes no meio, uma vez que a degradação natural dos fármacos foi baixa. Este estudo permite inferir a capacidade de biodegradação de fármacos por bactérias presentes em filtros CAB, e o possível uso destes microorganismos como alternativo de controle e remoção destas substâncias no tratamento de água potável.

PALAVRAS-CHAVE: Fármacos, biodegradação, água potável.

INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de água de boa qualidade associada a crescente emissão de compostos xenobióticos nos ambientes aquáticos representa um desafio à companhia de saneamento em todo mundo no tratamento e fornecimento seguro de água. Nas últimas duas décadas uma atenção especial tem sido dada pela comunidade científica à presença e contaminação por inúmeros compostos farmacêuticos em água potável (Fent et al., 2006; Sodré et al., 2007).

Os fármacos representam uma classe emergente de contaminantes ambientais que se encontram em amplo crescimento devido seu intenso uso médico em seres humanos e em animais. Este no cenário global reflete um grau de atenção aos operadores das estações de tratamento de água, em razão a difícil remoção destes compostos, podendo ser encontrados em níveis próximos de µg/L e ng/L na água bruta (Ponezi et al., 2006).



De acordo com Webb et al. (2003), são necessárias medidas e avaliações mais criteriosas por parte dos órgãos de controle ambiental e sanitário frente aos valores limites mínimos de exposição humana aos fármacos mediante casos de sua contaminação na água potável. Estes autores discorrem sobre os riscos inerentes às populações humanas quando expostas indiretamente a diversas drogas ativas e seus subprodutos durante o consumo de água potável (Webb et al., 2003).

Em um estudo recente realizado por Ghiselli (2006), na região metropolitana de Campinas (SP) foi constatada a presença de diferentes compostos xenobióticos, derivados de fármacos, hormônios sexuais e produtos industriais em águas superficiais e em água potável dessa região. Embora os valores encontrados neste estudo para uma série de compostos xenobióticos não tivessem tido caracterizado um efeito tóxico, a sua simples presença já implica sobre a necessidade de novos estudos direcionados ao seu monitoramento, e a melhor adequação nos processos de tratamento de água para remoção dessas substâncias quando detectadas (Ghiselli, 2006).

A presença de micropoluentes orgânicos, como os fármacos, nos mananciais de abastecimento é uma questão chave em relação à qualidade da água potável. Em razão dos riscos que os compostos farmacológicos representam à saúde humana, como também por sua difícil remoção no tratamento convencional de água (Jones et al., 2005), muitos estudos são direcionados ao desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas para sua remoção em águas contaminadas, de modo resguardar a qualidade destas águas no consumo humano.

A remoção de fármacos e outros micropoluentes podem, portanto, ser assegurada apenas utilizando técnicas mais avançadas, tais como ozonização, carvão ativado ou membrana de filtração (Ternes et al., 2002; Fent et al., 2006). No entanto, os custos econômicos no investimento no uso destas tecnologias avançadas de tratamento em uma maior escala são elevados (Fent et al., 2006).

Um importante processo na remoção dos fármacos na água, principalmente em efluente de esgoto é a biodegradação destas substâncias por meio do uso de microorganismos (bactérias), inativando parcialmente e/ou totalmente estes compostos sem a geração de subprodutos com efeitos semelhantes. A possibilidade de uso de microorganismos capazes de degradarem os fármacos na água representa uma medida alternativa para a remoção e controle destes compostos em águas destinadas ao abastecimento público.

Deste modo, o uso de filtros de carvão biologicamente ativado pode representar uma medida alternativa e/ou complementar para a remoção de compostos com propriedades recalcitrantes em ETAs, desde que sejam avaliados todos os parâmetros de adequação deste sistema em condições controladas de laboratório, para futuramente serem implantadas em sistemas de grande escala.

OBJETIVO

O presente estudo avaliou a biodegradação dos compostos farmacológicos paracetamol, cefalexina e diclofenaco de sódio na água por meio de bactérias presentes em filtros biológicos de carvão em condições de laboratório.

METODOLOGIA UTILIZADA

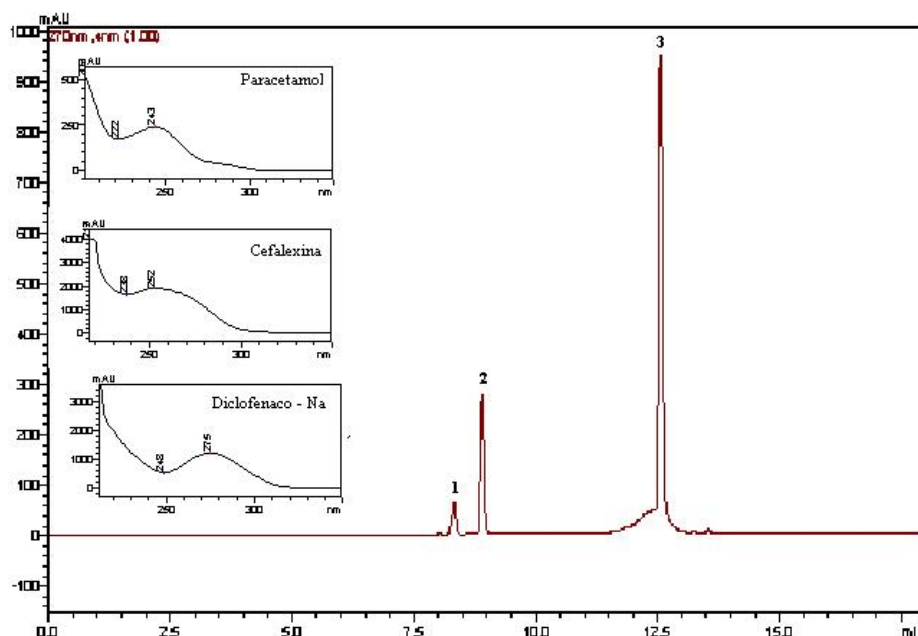
Para o experimento foi utilizada uma água de estudo coletada em um reservatório próximo, esterilizada (120° C – 15 minutos), contendo os compostos farmacológicos paracetamol (0,20 µg/mL), cefalexina (0,015 µg/mL) e diclofenaco de sódio (0,30 µg/mL). O ensaio foi realizado em dois galões de vidro (4L), âmbar, esterilizado, totalizando um tratamento. Foram usadas bactérias presentes no efluente de filtros biológicos de carvão (CAB) de uma pesquisa em curso no laboratório. Foram inoculados 10% (v/v) do efluente coletado de filtros CAB nos galões contendo a água de estudo e os fármacos. Para o controle foram usados dois galões de vidro (4L), âmbar, esterilizado, mantido sob mesmas condições, mas sem receber o inóculo de bactérias. O pH do meio foi corrigido em $7,9 \pm 0,1$, e os ensaios realizados no escuro com agitação orbital (200 rpm) a temperatura de 23° C.



Inicialmente no experimento, foi recolhida uma amostra (200 mL) de cada um dos tratamentos (tempo zero), seguida por coletas consecutivas semanais, para leitura do pH e determinação das concentrações dos fármacos testados. Este experimento teve a duração máxima de 77 dias.

A determinação dos fármacos (Figura 1), utilizado no estudo foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu), equipado com detector "Photodiode Array" (SPD-M20A), duas bombas de alta pressão (LC-20AT e LC 20AD), em coluna de fase reversa C-18 (modelo Shim-pack), com 4,6 x 250 mm e diâmetro de partícula de 5 µm, segundo Nebot et al. (2007), com adaptações. A fase móvel foi constituída por metanol e água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA). Foi utilizado um fluxo de 1 mL/min e um tempo de corrida de 18 minutos para cada amostra analisada, em triplicata.

Figura 1. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD de fármacos (controle). 1) Paracetamol (11.09), 2) Cefalexina (14.74) e 3) Diclofenaco de sódio (22.09). Coluna LC Column Shim-pack C₁₈ (250 mm x 4.6 mm ID, partículas de 5,0 µm), comprimento de onda de 240 nm.



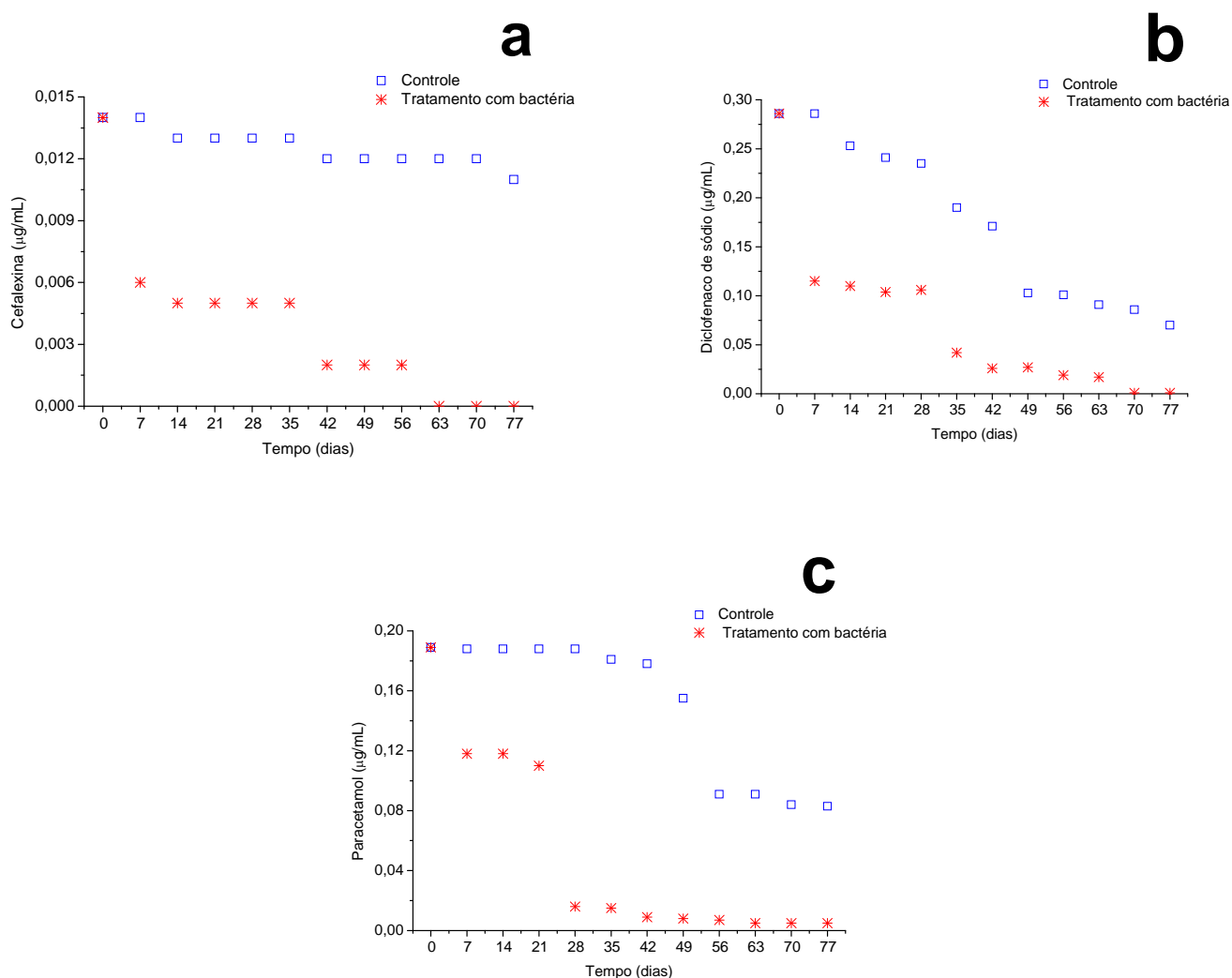
RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstraram que ocorreu a biodegradação dos três fármacos avaliados. Foi constatado que composto farmacológico apresentou uma elevada degradação na primeira semana de experimento, sendo esta biodegradação atenuada nas semanas seguintes por períodos de 1 até 5 semanas (Figura 2), sendo retomada esta biodegradação até o final do ensaio. Foi também constada a degradação natural dos compostos analisado, sendo esta diferenciada para cada composto.

O composto cefalexina foi aquele que apresentou a maior biodegradação entre aqueles testados em laboratório (Figura 2a), seguido posteriormente do diclofenaco de sódio (Figura 2b) e por fim o paracetamol (Figura 2c).



Figura 2. Degradação dos compostos farmacológicos cefalexina (a), diclofenaco de sódio (b) e paracetamol (c) entre os tratamentos testados durante o ensaio.



De modo geral foi verificado que a degradação dos fármacos testados durante todo o experimento. Os percentuais de biodegradação destes compostos foram elevados com valores máximos de 100% para cefalexina, 99% para o diclofenaco de sódio e 97% para o paracetamol (Tabela 1). O tratamento controle do experimento revelou que houve a degradação natural dos fármacos, sendo esta considerável ao final do experimento, com valores em medias de 57 e 56% para cefalexina e paracetamol, respectivamente, enquanto que o diclofenaco de sódio, que apresentou valores de até 75% em relação ao valor inicial utilizado (Tabela 1).

Estes resultados apontam para a capacidade de metabolização dos compostos farmacológicos testados por microrganismos (bactérias) presentes nos filtros biológicos de carvão. A capacidade dos microrganismos promotores da biodegradação dos fármacos no presente estudo apresentou concordância ao observado em outros trabalhos envolvendo o uso consórcios de bactérias como uma via de degradação de fármacos em ensaios de laboratório (Chua et al., 1996).



Tabela 1. Valores percentuais (%) de biodegradação e degradação natural dos fármacos testados durante o estudo.

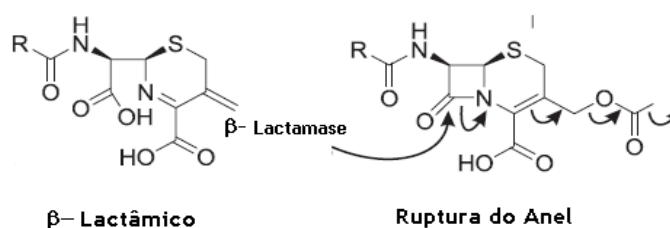
Composto	Biodegradação	Degradação natural
Cefalexina	100	57
Diclofenaco de sódio	99	70
Paracetamol	97	56

As substâncias avaliadas nesse estudo representam importantes grupos de drogas com diferentes estruturas químicas e modos de ação. Nenhum dos compostos avaliados foi biodegradado rapidamente, visto que o tempo necessário para essas substâncias atingirem valores não detectáveis foi entorno de 63 a 70 dias de ensaio. Contudo, os resultados indicaram capacidade de metabolização dos fármacos por microrganismos presentes no meio inoculante. De modo geral, o elevado decréscimo inicial dos compostos farmacológicos durante os primeiros 7 dias de experimento, possivelmente esteve associado à presença de comunidades de microrganismos que estariam utilizando esses compostos como fonte de carbono e energia.

Uma possível explicação para a elevada degradação dos fármacos durante a primeira semana de experimento seria em decorrência da presença dos compostos β -lactâmicos, como por exemplo, a cefalexina e seus metabólitos que podem ser uma fonte de nutriente na etapa de ambientação microbiana, segundo dados experimentais na literatura (Namiki et al., 1987; Sanyal et al., 1992). Os antibióticos do tipo cefalosporina, dentre os quais inclui-se a cefalexina, apresentam em sua estrutura o anel β -lactâmico, os quais são extremamente susceptíveis à degradação em solução aquosa. Inúmeros outros fatores podem atuar conjuntamente, influenciando o processo de degradação dos antibióticos β -lactâmicos, dentre esses destacam-se a temperatura, o pH, os teores de β -lactâmicos e a tensão de oxigênio dissolvido (Sanyal et al., 1992).

A diversidade microbiana presente no efluente dos filtros CAB possivelmente foi beneficiada por microrganismos que apresentavam atividade na produção da enzima β -Lactamase (Figura 3), o qual são altamente seletivas para substratos que contenham anel β -lactâmico (Blau et al., 2006). Portanto, presume-se que na primeira fase que corresponde a depleção inicial dos fármacos, a cefalexina poderia estar sendo utilizado como fonte de carbono e nitrogênio na atividade microbiana resultando em seu metabolismo energético.

Figura 3. Atuação da enzima β -Lactamase no anel β -lactâmico.



De forma similar descrita para cefalexina, a depleção inicial do paracetamol também poderia estar apresentando o mesmo comportamento frente a adaptação da comunidade microbiana em estar utilizando esse composto como fonte de carbono e energia. No ambiente aquático o paracetamol pode estar sob a forma de um sub-produto como o 4-aminofenol, o qual este é resultante de uma possível reação de desacetilação. Sistemáticamente o 4-aminofenol também pode ser sintetizado por outros tipos de vias, incluindo a via de rearranjo da fenilhidroxiamina através de uma solução sulfurosa (Sone et al., 1980). A sua presença no ambiente, ocorre quando os microrganismos não são hábeis em degradar este tipo de composto (Atlas, 1986).

O diclofenaco é uma droga antiinflamatória não esteróide (AINEs), qual apresenta uma relativa persistência no ambiente (Groning, et al., 2007). Um estudo realizado por Quintana et al. (2005) constatou que concentrações de diclofenaco (20,0 mg/L) apresentaram-se inalteradas no lodo ativado de uma ETEs durante um período de 28 dias. Contudo, Paje et al. (2002) reportou o crescimento de um biofilme lótico sob a



presença de elevadas concentrações de diclofenaco (100,0 µg/L) na água. Estes autores inferem a capacidade desses microrganismos constituintes do biofilme em metabolizar o diclofenaco como fonte de energia.

A depleção do diclofenaco de sódio durante o período inicial desse estudo poderia estar associada a uma prévia adaptação nas comunidades microbianas, as quais estariam utilizando esse composto como fonte de energia, como foi citado anteriormente para cefalexina e paracetamol. Embora nesse experimento não tenha sido utilizada água com sedimentos, os relatos científicos apresentados quanto ao uso de biofilmes demonstram haver uma remoção significativa para esses tipos de fármacos, por meio de processos de adsorção, o que não foi o caso. Porém, se for considerada a presença de uma diversidade biológica no efluente dos filtros de carvão biologicamente ativados utilizados como meio de inóculo dos ensaios, possivelmente estariam sendo promovida uma atividade microbiana nessa água de estudo com os fármacos testados.

Segundo López et al. (2005) a remoção de um determinado composto xenobiótico (e.g., pesticida) deve oferecer uma boa alternativa na relação custo-eficácia entre os métodos não biológicos utilizados para o tratamento de águas e solos contaminados. Os resultados encontrados nesse estudo evidenciaram uma eficácia das bactérias como agentes de degradação dos fármacos na água. Este padrão corrobora a tendência reportada na literatura sobre a importância das vias metabólicas dos microrganismos como uma forma de quebra das moléculas de alguns compostos xenobióticos (Schrapp et al., 2000; Johnsen et al., 2001).

A biodegradação é um importante processo em sistemas de tratamento de esgoto para remoção de diversas substâncias químicas. O monitoramento sobre a eficiência na remoção dos fármacos em sistemas de tratamento é de grande importância, pois, cada vez mais são necessárias adaptações, ou mesmo implantação de sistemas complementares de tratamento para a remoção destes compostos, uma vez que os sistemas convencionais de tratamento de água não possibilitam uma remoção segura na água para consumo humano (Ponezi, 2006).

A presença de fármacos no meio ambiente representa um risco, cada vez mais pesquisado no país, contudo associada a esta questão encontra-se uma normatização sanitária incipiente que regula a sua presença em águas destinadas ao consumo humano. No que tange ao tratamento da água, a possibilidade de uso de isolar microrganismos específicos ou consórcios microbianos adaptados em remover os compostos farmacêuticos, a partir de águas residuais ou água potável, pode representar uma medida considerável para o controle e remoção destas substâncias, possibilitando aumento na qualidade do tratamento da água. Desta forma, são necessários novos estudos envolvendo processos não convencionais para o tratamento de água contendo fármacos (e.g., uso de filtros biológicos de carvão) combinados aos processos convencionais já em operação nas Estações de Tratamento de Água (ETAs) para aumentar a eficiência na remoção dos mesmos.

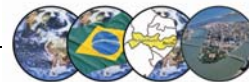
Em um segundo momento desta pesquisa, está prevista a caracterização fenotípica e filogenética dos microrganismos responsáveis pela degradação dos fármacos utilizando técnicas moleculares de sequenciamento com base em análises da região conservada do 16S rRNA do DNA metagenômico, este amplificado por meio da reação de PCR. Esta etapa sequencial representa um passo essencial para identificação e seleção dos consórcios de microbianos (e.g., bactérias) que degradam estas substâncias, com objetivo de suprirem seu metabolismo. Um avanço neste sentido poderá aumentar a eficiência de remoção dos compostos farmacológicos em sistema de tratamento de água, por meio de microrganismos especializados na biodegradação de fármacos como agentes colonizadores no leito de filtros de carvão, aumentando a eficiência na remoção destes micropoluentes quando presentes em águas aduzidas em ETAs.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Foi verificada a biodegradação dos fármacos por microrganismos presentes nos filtros de carvão com atividade biológica, sendo esta eficiente nas condições experimentais utilizadas;

A degradação natural dos fármacos foi um fator significativo durante o experimento, sendo este um parâmetro a ser considerado conjuntamente no processo de metabolização destes compostos pelos microrganismos;

O uso de microrganismos presentes em filtros de carvão com atividade biológica pode representar uma importante ferramenta de remoção de fármacos em sistemas de tratamento de água para o consumo humano;



Novos estudos são necessários nesta proposta, principalmente na caracterização fenotípica e genética destas bactérias associadas aos filtros biológicos de carvão capazes de biodegradar fármacos, e seu uso como inóculos em filtros biológicos de carvão.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº: 06/53502-0) pela bolsa concedida e o financiamento do projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATLAS, R.M., Basic and practical microbiology. **Water quality and biodegradation of water and pollutants**, vol. 9. New York: Macmillan Publishing Company, p. 721–738, 1986.
2. BLAU, L.; MENEGON, R. F.; CHIN-CHUNG, M., Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. *Quím. Nova*, 29(6): 1307-1317, 2006.
3. CHUA, H. I.; YAW, M. G. S. & NG., W. J., *Bacterial populations and their roles in a pharmaceutical-waste anaerobic filter*. Water Research, 30 (12), 3007-3016, 1996.
4. FENT, K; WESTON, A.A.; CAMINADA, D., Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 122-159, 2006.
5. GHISELLI, G., Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Tese de doutorado, 190p., 2006. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.
6. GRONING, J.; HELD, C.; GARTEN, C.; CLAUBNITZER, U.; KASCHABEK, S.R.; SCHLOMANN, M., Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*, 69: 509–516, 2007.
7. JOHNSON, K., JACOBSEN, C.S., TORRSVIK, V.; SØRENSEN, J., Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils-a review. *Biol. Fertil. Soils*, 33: 443–53, 2001.
8. JONES, O.A.; LESTER, J.N.; VOULVOULIS, N., Pharmaceuticals: a treat to drinking water? *Trends in Biotechnology*, 23 (4), 163 – 167, 2005.
9. LÓPEZ, L.; POZO, C.; RODELAS, B.; CALVO, C.; B. JUÁREZ, B.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J., Identification of Bacteria Isolated from an Oligotrophic Lake with Pesticide Removal Capacities. *Ecotoxicology*, 14, 299–312, 2005.
10. NAMIKI, Y.; TANABE, T.; KOBAYASHI, I.; TANABE, J.; OKIWIJRA, Y.; KODA, S.; MORIMOTO, Y., Degradation kinetics and mechanisms of a new cephalosporin, cefixime in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76: 208-214, 1987.
11. NEBOT, C; GIBB, S.W; BOYD, K.G., Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 598, 87–94, 2007.
12. PAJE, M.L.; KUHLCHE, U.; WINKLER, M.; NEU, T.R., Inhibition of lotic biofilms by diclofenac. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 488–492, 2002.
13. PONEZI, A.N.; DUARTE, M.C.T.; CLAUDINO, M.C., Fármacos em matrizes ambientais – revisão, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), 11p., 2006.
14. QUINTANA, J.B., WEISS, S., REEMTSMA, T., Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* 39, 2654–2664, 2005.
15. SANYAL, A.K.; CHOWDHURY, Y.; BANERJEE, A.B., Generation of high antimycotic activity during degradation of p-lactam antibiotic. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 221-223, 1992.
16. SCHRAP, S. M.; HEUVEL, H.; MEULEN, J.; RUITER, H.; PARSONS, J.R., A chemostat system for investigating pesticide biodegradation in continuous mixed bacteria cultures originating from surface water. *Chemosphere* 40: 1389-1397, 2000.
17. SODRÉ, F.F.; MONTAGNER, C.C.; LOCATELLI, M.A.F.; JARDIM, W.F. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 2 (2): 187-196, 2007.
18. SONE, T.; TOKUDA, Y.; SAHAI, T.; SHINKAI, S.; MANABE, O., Kinetics and mechanism of Bamberger rearrangement. Part 3. **Rearrangement of phenylhydroxylamines to p-aminophenols in aqueous sulfuric acid solution**. J C S Perkin; 2:298–302, 1980.



19. TERNES, T., MEISENHEIMER, M., MCDOWELL, D., SACHER, F., BRAUCH, H.-J., HAIST-GLUDE, B., PREUSS, G., WILME, U., ZULEI-SEIBERT, N., Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3855–3863, 2002.
20. WEBB, S.; TERNES, T.; GILBERT, M. & OLEJNICZAK, K., Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicology Letters*, 142, 157-167, 2003.