



I-298 - BIODEGRADAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS AMOXICILINA, AMPICILINA E CIPROFLOXACINA POR MEIO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM BIOFILROS 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

Juliana Polloni Silva

Acadêmica do curso Biologia 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.

Júlio Cesar Trofino

Licenciado e Bacharel em Química pela Universidade Federal de São Carlos. Técnicos com atribuições no Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia 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

A crescente ocorrência de fármacos nos mananciais de abastecimento representa um comprometimento à qualidade das águas utilizadas para o consumo humano. Estes compostos integram uma classe micropoluentes ambientais de elevada persistência na água, com efeito recalcitrante no tratamento convencional de água, e que apresentam sérias implicações à saúde humana. O desenvolvimento de novas tecnologias e aprimoramento daquelas existentes é imprescindível na remoção dos fármacos durante o tratamento de água para o consumo humano. Alguns trabalhos reportam sobre a suscetibilidade à degradação de diversos dos compostos farmacológicos por bactérias presentes na água, sedimento e efluentes de esgoto. Em razão destes aspectos, o presente estudo avaliou a biodegradação de três antibióticos por meio de microrganismos (bactérias) presentes em filtros biológicos de carvão (CAB) em condições de laboratório. Para o estudo foi utilizada uma água coletada em ambiente natural, esterilizada, o qual recebeu os antibióticos amoxicilina, ampicilina e ciprofloxacina, juntamente com o acrescido de um inóculo contendo microrganismos retirados do efluente de filtros CAB. O experimento foi realizado no escuro, em duplicata, com temperatura e agitação controlada, durante 98 dias, sendo retiradas amostras semanais para análises dos fármacos. Os resultados demonstraram que os antibióticos foram biodegradados por bactérias presentes no meio. 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 tratamento de água potável.

PALAVRAS-CHAVE: Antibióticos, biodegradação, amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina.



INTRODUÇÃO

O aumento na contaminação dos ambientes aquáticos por compostos xenobióticos tem despertado uma preocupação à comunidade científica mundial nas últimas décadas. Esta apreensão decorre do expressivo aumento destes contaminantes ambientais “emergentes” (provenientes das atividades industriais, agrícolas, de prescrição médica, hospitalares e de higiene pessoal) sobre as matrizes ambientais, e dos estudos escassos realizados sobre sua toxicidade, efeitos potenciais ao meio ambiente e à saúde humana (HERNÁNDEZ et al, 2007).

Atualmente a questão da poluição ambiental relacionada aos fármacos tem sido objeto de estudo em todo o mundo, visto que milhares de toneladas destes compostos tem sido produzidos e consumidos, tanto pelo homem como para em animais, e pelo fato dos recursos hídricos serem o componente final de depósito da contaminação destas substâncias (PONEZI et al., 2007).

No Brasil a pressão sobre as reservas de água doce tem aumentado expressivamente, em função do aumento de seu consumo, tanto para o abastecimento das cidades, quanto para o uso agrícola e industrial. Associada a esta problemática reside o fato que grande parte da quantidade de água que retorna ao espaço natural também é elevada, conseqüentemente com um aumento do volume de esgoto (urbanos, domésticos, industriais, agrícolas), que naturalmente levam resíduos aos corpos d’água, compromete a qualidade deste recurso.

A presença de fármacos no meio ambiente representa um risco em todo país. Associada a esta questão encontra-se uma normatização sanitária incipiente que regula a sua presença em águas destinadas ao consumo humano. No que tange a qualidade da água potável, os processos utilizados nos sistemas convencionais de tratamento de água não garantem a remoção de uma série de micropoluentes, especialmente os fármacos (JONES, et al., 2005). Contudo, novos processos de tratamento estão sendo investigados para implementação e disposição de novas tecnologias que possibilitem a remoção destes micropoluentes na água, assegurando seu consumo segundo as normas de qualidade recomendadas (TERNES et al., 2002).

Estudos recentes apontam para presença de diferentes compostos xenobióticos, derivados de fármacos, hormônios sexuais e produtos industriais em águas superficiais em regiões próximas aos grandes centros urbanos do país (GHISELLI, 2006). Parte desses estudos evidencia a presença em níveis próximos destes compostos entre as águas brutas e tratadas, o que demonstra a ineficiência durante este tratamento na ETA. Diante desse cenário tornam-se necessárias avaliações criteriosas da presença de fármacos em águas superficiais, por meio de programas de monitoramento destas águas, assim como a melhora na adequação nos processos de tratamento de água para remoção dessas substâncias quando detectadas (GHISELLI, 2006).

Uma série de avançadas tecnologias de tratamento de águas, tem sido avaliados quanto à sua eficácia em eliminar os compostos farmacológicos mais comuns a partir de águas contaminadas. Apesar da constatação de tecnologias de tratamento de águas (filtração com membrana e carvão, oxidação por ozônio, ultravioleta, peróxido de hidrogênio, nano-filtração, osmose reversa) poderem reduzir expressivamente os riscos de exposição aos fármacos na água, uma série de outros medicamentos (quimioterápicos) ainda tem sido considerada como compostos recalcitrantes (REYNOLDS, 2003).

Considerando estes aspectos, a possibilidade de isolar e utilizar 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.

A eficiência da biodegradação dos fármacos por meio de microorganismos pode vir a representar uma proposta promissora no processo de tratamento de água, principalmente quando as condições adequadas para a biodegradação puderem ser identificadas, e talvez impostas em sistemas de biofiltração, como a colonização por organismos específicos isolados e capazes de metabolizar eficientemente estes compostos farmacológicos.



OBJETIVO

O presente estudo avaliou a biodegradação dos antibióticos amoxicilina, ampicilina e ciprofloxacina por meio de bactérias presentes em filtros biológicos de carvão em condições de laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

DELINEAMENTO DO ENSAIO

Para este ensaio foram utilizados microrganismos (bactérias) presentes no efluente de filtros biológicos de carvão de uma Instalação Piloto de Filtração em Múltiplas Etapas da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira - SP. Foi utilizada uma água de estudo coletada em um reservatório, o qual foi filtrada ($1,0 \mu\text{m}$), esterilizada ($120^\circ\text{C} - 15 \text{ min}$), contendo os antibióticos amoxicilina ($324 \mu\text{g/L}$), ampicilina ($262 \mu\text{g/L}$) e ciprofloxacina ($252 \mu\text{g/L}$). O ensaio foi realizado em dois galões de vidro (4L) âmbar, esterilizado, representando um tratamento. Foram inoculados 10% (v/v) do efluente coletado do filtro de carvão nos galões contendo a água de estudo e os fármacos. Para o controle foram usados dois galões de vidro (4L) âmbar, esterilizado, mantido sob as mesmas condições descrito anteriormente, mas sem receber o inóculo com bactérias. Este ensaio foi realizado no escuro, com agitação orbital (100 rpm) e temperatura aproximada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Inicialmente no experimento, foi recolhida uma amostra (100 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 98 dias.

ANÁLISE DOS FÁRMACOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A determinação dos antibióticos utilizados 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 $4,6 \times 250 \text{ mm}$ e diâmetro de partícula de $5 \mu\text{m}$, 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.

RESULTADOS ENCONTRADOS

Os resultados obtidos demonstram que houve a biodegradação dos três antibióticos testados durante o experimento realizado. Pode-se verificar que o composto ciprofloxacina foi o que apresentou os maiores níveis de biodegradação (Figura 1), seguidos pela ampicilina (Figura 2), e enquanto que a amoxicilina (Figura 3) apresentou os valores ligeiramente reduzidos.

Em relação a velocidade em a biodegradação ocorreu para cada composto avaliado, constatou-se que ciprofloxacina e ampicilina apresentaram uma rápida biodegradação entre a segunda e terceira semana de ensaio, respectivamente, enquanto que amoxicilina obteve uma degradação gradativa, com níveis mais elevados após a sexta semana de experimento.

Foi verificada a degradação natural dos fármacos durante o ensaio, sendo esta significativa durante o experimento. Esta condição representa um parâmetro a ser considerado conjuntamente no processo de metabolização destes compostos pelos microrganismos e na comparação do balanço final da remoção dos fármacos.

O pH entre os tratamentos testados revelaram um comportamento de semelhança entre estes, com valores próximos das neutralidade (Figura 4).



Figura 1. Valores detectados de ciprofloxacina entre os tratamentos durante o ensaio

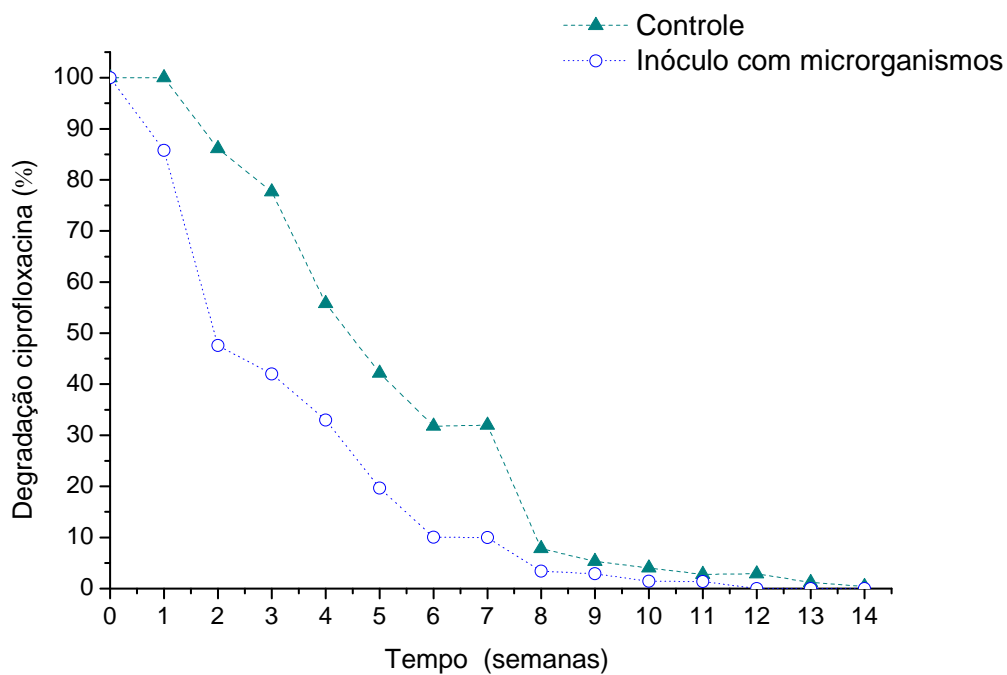
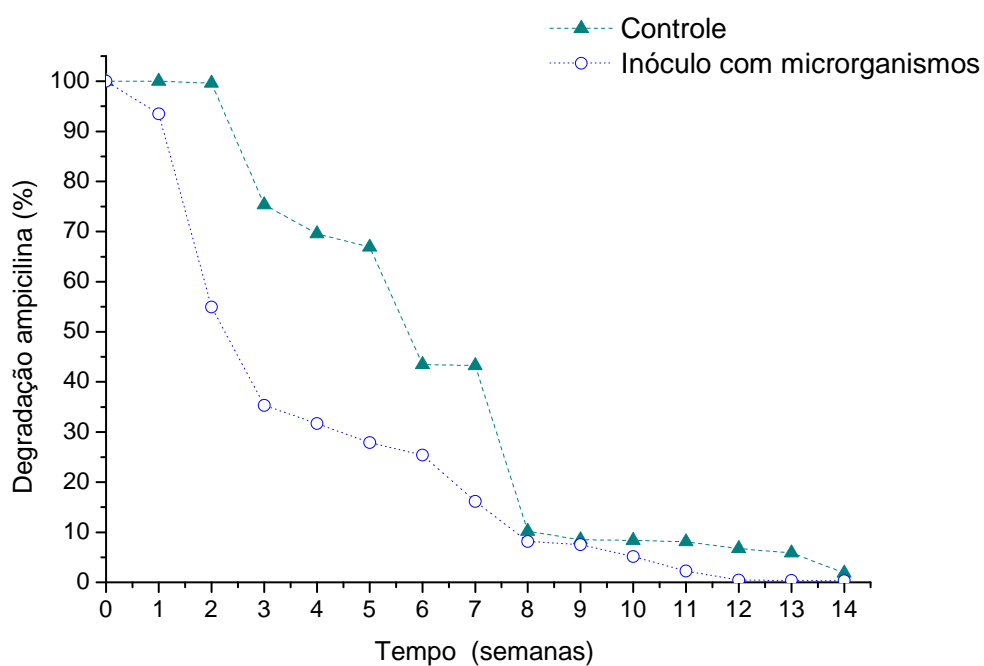
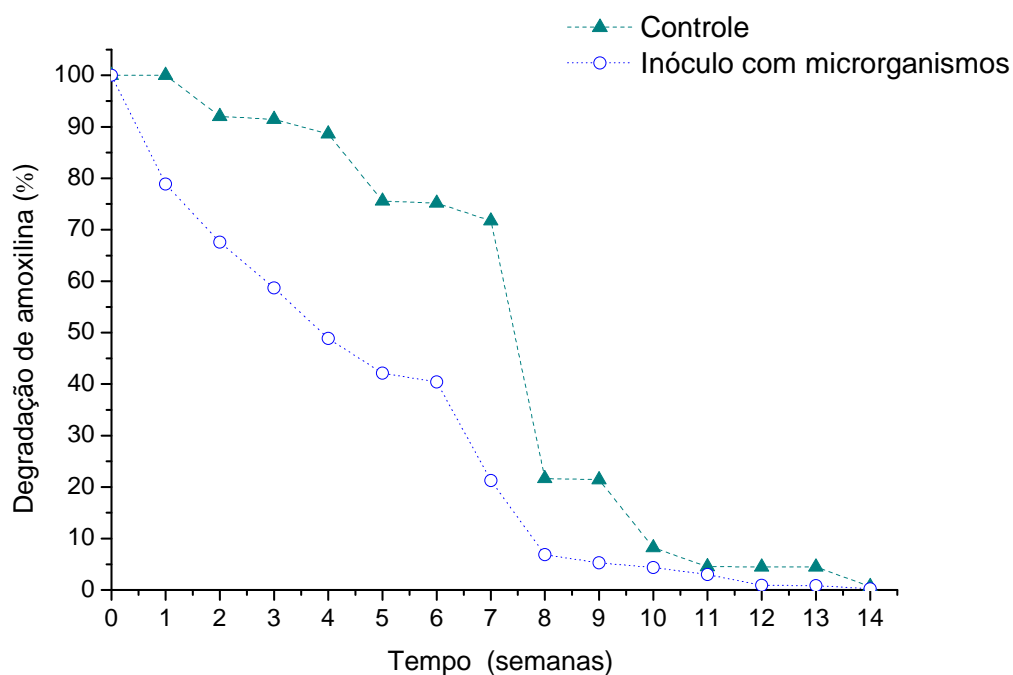
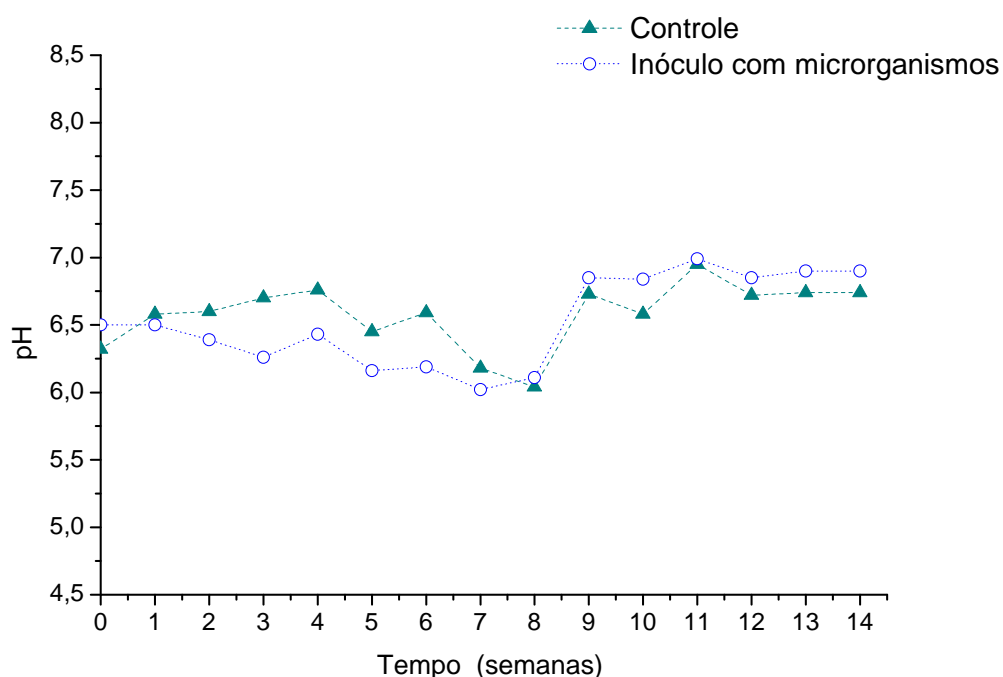


Figura 2. Valores detectados de ampicilina entre os tratamentos durante o ensaio



**Figura 3. Valores detectados de amoxicilina entre os tratamentos durante o ensaio****Figura 4. Valores de pH entre os tratamentos durante o ensaio**

De modo geral pode-se verificado que a degradação dos fármacos testados durante todo o experimento atingiu valores máximos de 100%. Estes resultados apontam diretamente 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).



O uso de microrganismos com potencial em degradar estes compostos xenobióticos representa a busca por novas tecnologias que minimizem o potencial poluidor gerado nos efluentes descartados nos mais diversos segmentos (esgoto sanitário, hospitalar, industrial, produção animal), sem gerar novos poluentes, tendo em vista ser esta uma preocupação de interesse público, governamental e industrial.

Esta preocupação resulta principalmente dos riscos que os antibióticos constituem, visto ser esta uma classe de fármacos considerada uma das mais problemáticas para o ambiente. Isto decorre de sua baixa biodegradabilidade e efeito tóxico sobre bactérias (KÜMMERER, 2003) além da potencialidade de promover o desenvolvimento de espécies mais resistentes (FENT et al., 2006). O aumento da produção e do uso de antibióticos durante as últimas décadas tem ocasionado uma seleção genética de bactérias mais prejudiciais, provocando mudanças no código genético das mesmas e efeitos irreversíveis.

A eliminação de antibióticos não metabolizados em ambientes aquáticos é, particularmente, relevante. Estudos mostram que a remoção de fármacos em estações de tratamento de água e efluentes é muitas vezes incompleta, para que sejam lançados em água superficiais ou para consumo humano (TERNES et al. 2002; HERNÁNDEZ et al. 2007).

Os resultados obtidos apontam para a capacidade dos microrganismos (bactérias) presentes nos filtros biológicos de carvão como possíveis agentes de remoção dos antibióticos avaliados. O conhecimento a partir dos microrganismos responsáveis pela metabolização (biodegradação) dos antibióticos e sua efetiva capacidade de consumir estas substâncias, representa um passo importante aos estudos direcionados a identificação dos organismos e das condições ideais de eliminação destas substâncias em águas contaminadas destinadas ao abastecimento público.

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 (SCHRAP 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

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

Houve a biodegradação de antibióticos pelas bactérias, demonstrando a capacidade desses microorganismos em metabolizarem estes compostos;

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 microorganismos;

O uso de microorganismos 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, especialmente na caracterização das espécies e consórcios de bactérias associados aos filtros de carvão com atividade biológica, de modo a selecionar linhagens específicas capazes de metabolizarem eficientemente uma série de compostos farmacológicos presentes na água, e o uso destes microorganismos 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- 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.
- 2- FENT, K; WESTON, A.A; CAMINADA, D., Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76: 122–159, 2006.
- 3- 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, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, SP, [s.n], 2006.
- 4- HERNÁNDEZ, F.; SANCHEZ, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C., Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (6):466-485, 2007.
- 5- JOHNSEN, 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.
- 6- JONES, O.A.; LESTER, J.N.; VOULVOULIS, N., Pharmaceuticals: a treat to drinking water? *Trends in Biotechnology*, 23 (4), 163-167, 2005.
- 7- KÜMMERER, K., Significance of antibiotic in the environment. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 5-7., 2003.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10- PONEZI, A.N.; DUARTE, M.C.T.; CLAUDINO, M.C., Fármacos em matrizes ambientais – revisão, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBAUNICAMP), 11p., 2006.
- 11- 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.
- 12- REYNOLDS, K.A., Pharmaceuticals in drinking water supplies. *WCP & Internacional*, 45(6): Disponível em <<http://www.wcponline.com/NewsView.cfm?ID=2199>>, acessado em 01 de novembro de 2008, 2003.



- 13- 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.